

## Tesis de Posgrado

# Estudios de difusión rotacional en moléculas fluorescentes a través de una doble excitación con pulsos láser ultracortos

Torga, Jorge Román

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Físicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Torga, Jorge Román. (1999). Estudios de difusión rotacional en moléculas fluorescentes a través de una doble excitación con pulsos láser ultracortos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3104\\_Torga.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3104_Torga.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Torga, Jorge Román. "Estudios de difusión rotacional en moléculas fluorescentes a través de una doble excitación con pulsos láser ultracortos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3104\\_Torga.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3104_Torga.pdf)

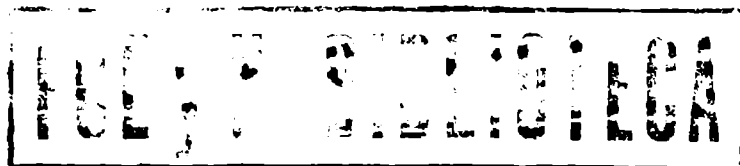
**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Física**

**Estudios de difusión rotacional en moléculas fluorescentes a  
través de una doble excitación con pulsos láser ultracortos**

**por Jorge Román Torga**

**Director de Tesis: Mario Carlos Marconi**

**Lugar de Trabajo: Laboratorio de Electrónica Cuántica, Dpto. de Física,  
FCEyN, UBA**

**Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias  
Físicas**

**15 de febrero de 1999.**

2100

# **Estudios de difusión rotacional en moléculas fluorescentes a través de una doble excitación con pulsos láser ultracortos**

**Palabras claves:** fluorescencia, difusión rotacional, láser.

## **Resumen**

En este trabajo se presenta una nueva técnica para la determinación de tiempos de difusión rotacional en moléculas fluorescentes, a través del estudio de la fluorescencia producida después de la excitación con dos pulsos láser ultracortos.

La técnica presenta la posibilidad de medir con resolución temporal limitada sólo por el ancho del pulso, sin necesidad de detectores rápidos. La idea central, es obtener los tiempos de difusión midiendo la energía total de fluorescencia en función del retardo entre pulsos. Partiendo de un modelo de molécula esférica o elipsoidal, se propuso una ecuación de difusión para describir la evolución de la población de moléculas excitadas. Como consecuencia, se obtuvieron expresiones para la energía de fluorescencia total, y se estudió su dependencia con los tiempos de difusión y los distintos parámetros del sistema (energía de excitación, orientación de los dipolos de absorción y emisión, retardo entre pulsos, etc.)

Se muestra también, en este trabajo, los distintos esquemas experimentales montados para realizar mediciones de energía de fluorescencia en función del retardo entre pulsos. Finalmente, se muestran los valores para los tiempos de difusión rotacional obtenidos, a partir de estas mediciones en algunas muestras testigo.

## **Study of rotational diffusion times in fluorescent molecules through a double excitation with ultrashort laser pulses**

**Key words:** fluorescence, rotational diffusion, laser

## **Abstract**

This work presents a new technique for molecular rotational diffusion times determination in fluorescent samples through the study of fluorescence produced after two-pulse excitation.

The technique has the possibility of doing measurements with time resolution only limited by the excitation pulse-width, without the use of fast detectors.

Rotational diffusion times are derived by measuring total fluorescence energy as a function of time delay between pulses. From the model of spherical or ellipsoidal molecules, a diffusion equation to describe the evolution of the population of excited

molecules was considered. Expressions for the total fluorescence energy were obtained. It was also studied its dependence with the time rotational diffusion and different parameters of the system (excitation energy, dipole orientation, shape of the molecule, Etc).

In this thesis, it also shown the different experimental set-ups built to measure fluorescence energy as a function of the time delayed between pulses.

Finally, from these measurements, the results obtained for the rotational diffusion times in some specific samples are shown.

# Indice

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>3</b>
1.1	Presentación y antecedentes del problema . . . . .	3
1.2	Objetivos y descripción de la técnica propuesta. . . . .	9
1.2.1	Objetivos . . . . .	9
1.2.2	Descripción . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Modelo</b>	<b>13</b>
2.1	Consideraciones Generales . . . . .	13
2.2	Ecuación de movimiento del fluoróforo. . . . .	14
2.3	Ecuación de difusión . . . . .	20
2.3.1	Excitación con el segundo pulso. . . . .	21
2.4	Moléculas esféricas . . . . .	24
2.5	Expresiones para las intensidades de fluorescencia . . . . .	31
2.6	Expresiones para la energía diferencial . . . . .	33
2.6.1	Energía diferencial total . . . . .	37
2.6.2	Energía diferencial sin polarizar . . . . .	40
2.6.3	Comparación entre las distintas energías diferenciales . . . .	40
<b>3</b>	<b>Moléculas elipsoidales</b>	<b>45</b>
3.1	Excitación de la muestra . . . . .	46
3.1.1	Dipolo en el eje $z$ . . . . .	50
3.1.2	Dipolo en el plano $xy$ . . . . .	51
3.1.3	Energía diferencial total. . . . .	52
3.1.4	Energía diferencial no polarizada . . . . .	55
<b>4</b>	<b>Esquema experimental</b>	<b>57</b>
4.1	Breve descripción . . . . .	57
4.2	Esquema general . . . . .	59
4.3	Sistema de láser de colorantes . . . . .	60
4.3.1	Descripción general del sistema construido . . . . .	61
4.3.2	Experimento . . . . .	65
4.4	2 Sistema de pulsos ultracortos. . . . .	73
4.4.1	Láser de Nd- YAG . . . . .	73
4.4.2	Láser de Ti-zafiro . . . . .	75

4.4.3	Análisis de las características de los dos haces en la zona de superposición. . . . .	80
4.4.4	Muestra . . . . .	87
4.4.5	Sistema de detección. . . . .	90
4.4.6	Energía de excitación y fracción de moléculas excitadas . .	92
4.4.7	Detección con el lock-in . . . . .	93
4.4.8	Resultados experimentales . . . . .	96
5	Conclusiones	101

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 Presentación y antecedentes del problema

Cuando una muestra fluorescente es iluminada con luz linealmente polarizada la fluorescencia producida presenta anisotropía en la polarización, aún cuando la muestra excitada sea isotrópica. Esta anisotropía se debe a que la excitación se produce en un eje preferencial fijado por la polarización del haz incidente. Esto induce una distribución angular no homogénea de la población de moléculas excitadas y de las que permanecen en el estado fundamental. Este fenómeno se conoce como fotoselección y se manifiesta en una variación en la polarización de la fluorescencia producida después de la excitación. Por lo tanto, si se mide la fluorescencia polarizada, la intensidad de fluorescencia medida en la dirección paralela a la excitación será distinta a la medida en la dirección perpendicular. Esta diferencia en las intensidades se denomina anisotropía de fluorescencia y constituye una poderosa herramienta para el estudio de propiedades dinámicas en una gran variedad de moléculas orgánicas, colorantes y moléculas de interés biológico como ácidos nucleicos y proteínas inmersos en distintos medios: líquidos, polímeros, geles, nuevos materiales compuestos etc. [1], [2], [3], [4].

Las primeras observaciones de anisotropía de fluorescencia se remontan a principios de siglo en los trabajos de Lummer [5] y Weigert [6]. A partir de esos experimentos el análisis de la anisotropía de fluorescencia ha tenido un enorme desarrollo y ha dado origen a distintas técnicas con aplicación en fotoquímica, biología y medicina.

Entre las numerosas aplicaciones que utilizan este fenómeno podemos mencionar: estudios de migración de carga entre moléculas [2], espectroscopía de absorción y emisión [3], mecanismos de relajación de estados excitados [2], estudios de propiedades estructurales de la molécula tales como su forma, dimensión y momento dipolar [7], cambios estructurales de los estados excitados, interacción de la molécula con su entorno sea éste un solvente, una red cristalina o la matriz de un polímero [2] y otras.

Las moléculas fluorescentes, a las que llamaremos a lo largo de este trabajo fluoróforos, pueden encontrarse en la muestra en forma natural o bien introducirse en forma artificial. En este último caso la molécula fluorescente, cuyas propiedades son bien conocidas, se encuentra en la muestra a manera de una "sonda óptica" pudiéndose estudiar, a través de la misma, propiedades del medio en el que ésta se encuentra inmersa.

Para la descripción de la anisotropía de fluorescencia el esquema más simple es suponer que la molécula fluorescente es esférica, rígida, y tiene un dipolo de absorción coincidente con el de fluorescencia. Se puede suponer que la distribución de moléculas fluorescentes es homogénea antes de la excitación y que cada molécula tiene dos niveles el fundamental y el excitado, al que pasa cuando absorbe un fotón. Después de la excitación tendremos entonces, una población de moléculas en el estado excitado y una población de moléculas en el estado fundamental. Con estas suposiciones se puede obtener en forma teórica una expresión de anisotropía que se conoce como anisotropía fundamental y que tiene valor máximo. Sin embargo existen una serie de factores de despolarización que modifican esta anisotropía máxima que se obtendría en sistemas ideales. Estos factores pueden ser de dos tipos:

- 1- en primer lugar, aquellos que están relacionados con cambios internos en la estructura de la molécula, que pueden producirse tanto en la absorción, en la emisión, o entre ambos procesos.
- 2- el otro grupo de factores que intervienen en la despolarización está relacionado con la interacción del fluoróforo con el medio en el que se encuentra. Aquí podemos mencionar el movimiento de rotación de la molécula y las interacciones eléctricas de ésta con el medio,



entre otras.

En este trabajo tendremos en cuenta fundamentalmente esta última clase de factores de despolarización relacionados a la interacción con el medio a través de parámetros como : viscosidad, temperatura, desplazamiento de volumen de solvente, fricción dieléctrica, etc. Si la molécula estuviera inmóvil en el medio, la anisotropía de fluorescencia tendría un valor máximo y constante en el tiempo. Sin embargo, en una situación real, la interacción del fluoróforo con el medio hace que la anisotropía inicial relaje hacia una situación de equilibrio, donde la distribución angular de moléculas fluorescentes vuelve a ser homogénea y la anisotropía se anula.

Dentro de los factores que influyen en la relajación, pondremos especial atención al movimiento de rotación del fluoróforo. O sea que, a partir de la excitación inicial que crea una distribución de moléculas excitadas, supondremos que es el movimiento de rotación el factor predominante que tiende a volver a la muestra homogénea. En este caso la anisotropía de fluorescencia es una magnitud apropiada para determinar esta evolución. La descripción teórica del movimiento de rotación puede hacerse suponiendo que la misma sigue un proceso de difusión hacia el equilibrio a partir de la excitación. Esta idea asume que el factor predominante de la despolarización es el movimiento browniano de rotación, que surge de suponer que el proceso de despolarización se produce fundamentalmente por las sucesivas colisiones entre el fluoróforo y el medio. Si bien existen numerosas teorías sobre la dependencia del coeficiente de difusión con los parámetros de la molécula y el medio en que ésta se encuentra, no existe todavía una teoría a nivel molecular que permita predecir el movimiento en forma general teniendo en cuenta todos estos factores.

Ya en 1929 Debye [8] mostró que el movimiento de reorientación puede ser descripto planteando una ecuación de difusión angular basada en la teoría de movimiento browniano de translación. En una importante cantidad de sistemas estudiados es posible ajustar los valores experimentales de los tiempos de rotación a través de este modelo de rotación difusional conocido como modelo hidrodinámico de Debye-Stokes-Einstein (D. S. E.). En el mismo el soluto es tomado como una esfera o un elipsoide y el solvente como un continuo

de viscosidad  $\eta$  .

Esta teoría es luego extendida para el caso de moléculas más complejas [9], [10] y [11], y posteriormente se publican varios trabajos manteniendo la descripción hidrodinámica, pero introduciendo modelos mas sofisticados que modifican la interacción soluto-solvente [13] o introducen distintas condiciones de contorno en la resolución de las ecuaciones hidrodinámicas [14], [15], [16], [17], [18] .

Hasta fines de 1970 los resultados experimentales y teóricos se basaron en la interpretación de la teoría hidrodinámica, aunque se muestra en varios trabajos, que la misma no se ajusta correctamente a los resultados obtenidos [7]. Como consecuencia surgen nuevas teorías que incluyen efectos microscópicos, además de los colectivos ( hidrodinámicos)[19], [20]. Una revisión en la evolución de las distintas teorías se puede encontrar en [17], [18]. En forma independiente del modelo utilizado el proceso de difusión lleva a que la población de moléculas excitadas y las moléculas en estado fundamental evolucionen con un tiempo característico hacia el equilibrio. En el caso en que el fluoróforo es de forma esférica un solo tiempo caracteriza todo el proceso, si la molécula es más compleja pueden ser varios. La relación entre estos tiempos y la gran cantidad de variables de las que depende (temperatura, viscosidad, volumen, etc.) se resume en el tensor de difusión. En este trabajo no entraremos en el detalle de la dependencia del tensor con estas magnitudes. La expresión más aceptada para estos tiempos a los que llamaremos tiempos de difusión rotacional es:

$$\tau = \frac{\eta V}{kT} f C + \tau_o \quad (1.1)$$

donde  $V$  es el volumen de la molécula que esta rotando,  $\eta$  es la viscosidad del medio,  $k$  es la constante de Boltzman,  $T$  es la temperatura,  $f$  es el coeficiente de fricción y  $C$  es un parámetro determinado por las condiciones de contorno impuestas entre el soluto y el solvente. La interpretación de este coeficiente se extiende en algunos trabajos, al considerar su dependencia con la forma de la molécula, la relación entre su volumen y el volumen de la molécula de solvente, el volumen libre, etc [17].

El valor de  $\tau_0$  se obtiene en general por modelos no hidrodinámicos y está relacionado con el tiempo de rotación libre del fluoróforo. En muchos casos este valor se considera nulo. Asumiendo un proceso de difusión, e independientemente del modelo usado para el tensor de difusión, Furry [21] y Favro [22], encontraron expresiones para la población de moléculas excitadas en función del tiempo suponiendo una distribución inicial arbitraria. En estos trabajos, se utiliza la equivalencia entre la ecuación de difusión y la ecuación de Schoëdinger, para la resolución de la evolución de la población de moléculas excitadas, aplicando la función de Green para el caso general de una molécula asimétrica.

A partir de los resultados obtenidos por Favro et al, y de las contribuciones de Lombardi y Dafforn [23], Tao T [24] y Weber [25] entre otras, resultan tres teorías similares en los trabajos de Ehrenberg y Riegler [28], Belford y Belford [29] y Chuang y Eisinger [26]. En estos trabajos se obtienen expresiones para las intensidades de fluorescencia para el caso de moléculas asimétricas mostrando su dependencia con los tiempos de difusión rotacional. Se asume también, que el dipolo de absorción y emisión se encuentra ubicado en forma arbitraria dentro de la molécula y se muestra que, en el caso general de moléculas asimétricas, es posible obtener hasta seis tiempos de difusión distintos aunque no independientes.

Los primeros trabajos experimentales para la determinación de estos tiempos de rotación difusional surgen a principio de siglo, y fueron realizados por Perrin [9],[10] utilizando fuentes de excitación continua. En estos trabajos se supuso el caso de moléculas esféricas y elipsoidales, planteando un mecanismo de despolarización browniano. Posteriormente Jablonski [27] relaciona estas expresiones con la anisotropía de fluorescencia, estudiando además otros efectos en la despolarización de la molécula.

Si bien utilizando fuentes de excitación continua se han obtenido una gran cantidad de resultados experimentales [7], es necesario en todos los casos suponer un modelo a priori de los mecanismos de relajación para obtener los valores de los tiempos de difusión.

Un progreso considerable se obtuvo con el surgimiento de los láseres pulsados, ya que con los mismos se logra una fuente de excitación rápida que permite determinar en forma

directa los tiempos de difusión.

En 1969 Eisinger y Drexler [30] reportan la primera observación directa de un tiempo de reorientación molecular usando un láser de excitación funcionando en el régimen de picosegundos. A partir de allí los trabajos experimentales tuvieron un gran impulso que mejoró aún más con la aparición de láseres de pulsos ultracortos ( $< 1$  ps).

En la actualidad existen varias técnicas que permiten determinar tiempos rotacionales con resolución en el orden del picosegundo o aún menores. Recopilaciones y discusiones de las diversas técnicas pueden encontrarse en [1], [4], [3].

Entre las más importantes podemos mencionar dos, la primera basada en la absorción transiente y la segunda basada en la mezcla de frecuencias.

a) en el primer caso la técnica se basa en métodos de absorción con la excitación de dos pulsos [1]. La idea de la misma es excitar la muestra con un pulso de luz polarizada y modificar la distribución angular de la población de moléculas de la muestra. La relajación de las moléculas es sensada midiendo la absorción de un segundo pulso de prueba en función del retardo entre pulsos.

Esta técnica fue introducida para la medición de tiempos de relajación por Shank y Ippen [31] al proponer una variante interesante en la cual los dos pulsos de excitación tienen un ángulo de  $45^\circ$  en sus ejes de polarización. La intensidad del pulso de prueba es monitoreada en función del retardo entre pulsos después de pasar por un analizador ortogonal con la dirección de polarización del segundo pulso. Esta técnica fue mejorada por D. Waldeck y Fleming [32] y luego extendida por los mismos autores al caso en el cual la absorción se produce en múltiples niveles [34]. En la actualidad el método se conoce como "Optically heterodyned polarization spectroscopy" y ha dado lugar a numerosos trabajos [36], enfocados principalmente al estudio de la dependencia del tensor de difusión con la temperatura, la viscosidad, y los efectos de la fricción dieléctrica en la determinación de los tiempos de difusión.

Otra variante de esta técnica que utiliza tres pulsos de excitación es conocida como "Transient grating absorption". En este caso, dos pulsos de excitación con polarizaciones parale-

las se enfocan superpuestos en la muestra produciendo un patrón de interferencia. Como consecuencia la muestra presenta una modulación en el índice de refracción que encuentra un tercer pulso incidente. Esta modulación hace que este último pulso sea difractado y, a partir del análisis de la señal difractada en función del retardo introducido, se obtienen los tiempos de difusión. Esta técnica fue ensayada por Phillion et al [37], y Vonjena et al [38], y luego por Moogb et al [39], quien consigue una resolución de 100 ps.

b) El segundo esquema, se basa en la medición de fluorescencia resuelta en el tiempo después de una excitación con un pulso láser ultracorto ( $\simeq 100fs$ ). La resolución temporal es del orden de los 500fs. y se obtiene midiendo la señal generada por mezcla de frecuencias, al superponer la fluorescencia con el pulso incidente en un cristal no lineal. Midiendo la fluorescencia polarizada en forma paralela y perpendicular a la dirección de excitación se calcula la anisotropía de fluorescencia de donde se obtienen los tiempos de difusión. Esta técnica desarrollada por Fleming [4] y en la actualidad denominada "up conversion" fue aplicada en los trabajos de. R. Moog y Marroncelli [46] y Horng y Marroncelli [44] utilizando un láser de Titanio-zafiro y distintas coumarinas como fluoróforo. Estos trabajos han sido tomados como referencia en gran parte del trabajo experimental realizado en esta tesis.

## 1.2 Objetivos y descripción de la técnica propuesta.

### 1.2.1 Objetivos

En este trabajo se presenta una nueva técnica para la determinación de tiempos de difusión rotacional, a través del estudio de la fluorescencia producida después de la excitación con dos pulsos [47], [53], [54].

La técnica presenta la posibilidad de medir con resolución temporal, limitada sólo por el ancho del pulso, sin necesidad de detectores rápidos, y en forma directa ya que solamente es necesario medir la fluorescencia total después de la excitación. La posibilidad de usar fuentes de excitación en el orden del femtosegundo permite el estudio del movimiento de rotación de la molécula fluorescente y de su interacción con el solvente en una escala de

tiempo donde todavía es muy poco lo que se conoce.

La implementación de la técnica permite también realizar estudios de absorción que se complementan con los de fluorescencia para determinar los tiempos de difusión tanto en la molécula en estado excitado como en el fundamental.

A través de estas expresiones para la energía de fluorescencia paralela y perpendicular al eje de excitación en función del tiempo y el cálculo de la anisotropía de rotación se puede obtener el tiempo de despolarización de estas moléculas al que llamaremos tiempo de difusión rotacional.

Para el sistema que proponemos el factor predominante de la despolarización es el movimiento browniano de rotación producido por las colisiones entre los fluoróforos y el solvente en el que se encuentran disueltos.

### 1.2.2 Descripción

En la técnica propuesta la excitación se realiza con dos pulsos láser iguales que inciden sobre la muestra con un retardo controlado entre ellos. El primer pulso crea una distribución espacial de moléculas excitadas que, al decaer y relajar debido al movimiento de rotación de las moléculas fluorescentes, producen una intensidad de fluorescencia determinada. Esta primera excitación crea anisotropía también en la población de moléculas en el estado fundamental.

El segundo pulso incide sobre la muestra cuando todavía hay moléculas excitadas por el primer pulso. Esto hace que la distribución de moléculas no excitadas que encuentra sea diferente de la distribución homogénea que encontró el primero. Como además podemos variar el retardo entre pulsos, se puede muestrear cómo varían las intensidades y energías de fluorescencia, para un rango de valores de retardo mayores al ancho de pulso y menores al tiempo de fluorescencia.

La idea central de la técnica propuesta consiste entonces en la medición de la energía total de fluorescencia producida por los dos pulsos de excitación en función del retardo. Debido a la anisotropía producida en la distribución espacial de moléculas excitadas por el

## **1.2. OBJETIVOS Y DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA PROPUESTA. 11**

primer pulso, esta energía de fluorescencia, será diferente de la mera suma de intensidades producida cuando los dos pulsos están separados por un retardo mucho mayor que el tiempo de fluorescencia o sea cuando no interactúan.

Comparando la energía de fluorescencia total producida a un retardo fijo, por la doble excitación, con la que se obtendría en el caso en que los dos pulsos estuvieran separados por un retardo infinito, podemos obtener información del tiempo de despolarización. A esta diferencia la llamaremos energía diferencial de fluorescencia y será la magnitud central en el desarrollo de este trabajo. A través de la curva de energía diferencial en función del retardo podemos obtener los tiempos de difusión rotacional, objetivo final en la mediciones del método propuesto.

En lo que sigue, este trabajo se presenta con el siguiente esquema: En el segundo capítulo se describe la idea de la técnica propuesta, el modelo teórico utilizado y las suposiciones tenidas en cuenta en el modelo. Se presentan también las ecuaciones que describen la evolución de la población de moléculas excitadas y no excitadas después del doble pulso, y se definen los conceptos de población diferencial y energía diferencial que constituyen la idea central de este trabajo.

Se estudia el caso particular en donde el fluoróforo se supone de forma esférica, se obtienen las expresiones de energía diferencial y su dependencia con el tiempo de difusión.

En el tercer capítulo, se estudia el caso más general donde la molécula tiene forma elipsoidal, obteniendo expresiones para la energía diferencial cuando el dipolo se encuentra sobre el eje de simetría o en dirección ortogonal a este eje.

Finalmente en el cuarto capítulo se describe el trabajo experimental desarrollado y se muestran los resultados obtenidos.





# Capítulo 2

## Modelo

### 2.1 Consideraciones Generales

En éste capítulo se obtienen las expresiones de energía de fluorescencia, después de una doble excitación de la muestra, a través de la resolución de una ecuación de difusión. En el modelo propuesto, se tendrán en cuenta las siguientes suposiciones :

- El sistema en estudio es un conjunto de moléculas fluorescentes inmersas en un solvente con sólo dos niveles, el fundamental y el excitado.
- La concentración de fluoróforos es lo suficientemente baja como para despreciar las interacciones entre sí, sólo tendremos en cuenta la interacción con el medio en el que está inmerso.
- La molécula es rígida y no sufre ninguna modificación estructural entre la absorción y la emisión.
- Trataremos exclusivamente el movimiento de rotación del fluoróforo sin considerar su dependencia con los parámetros del solvente. La interacción entre solvente y soluto se describe a través de un tensor de difusión, y no entraremos en la descripción detallada de la dependencia de este tensor con las características del fluoróforo y del medio. Es decir que suponemos que el fluoróforo está sometido a un número muy grande de "colisiones " con el solvente y esto permite tratar el problema como un movimiento de rotación browniano.

## 2.2 Ecuación de movimiento del fluoróforo.

Para definir la orientación del fluoróforo utilizaremos dos sistemas de referencia, un sistema de laboratorio que llamaremos a lo largo de este trabajo  $X - Y - Z$ , y otro sistema fijo a la molécula que llamaremos  $x - y - z$ , según se muestra en la figura 2.1.

Definimos también el vector  $u(\alpha, \beta, \gamma)$ , que determina la dirección del dipolo de absorción y emisión de la molécula. La terna  $\alpha, \beta, \gamma$  representa los ángulos de Euler [42] medidos desde el sistema de laboratorio al sistema fijo a la molécula.

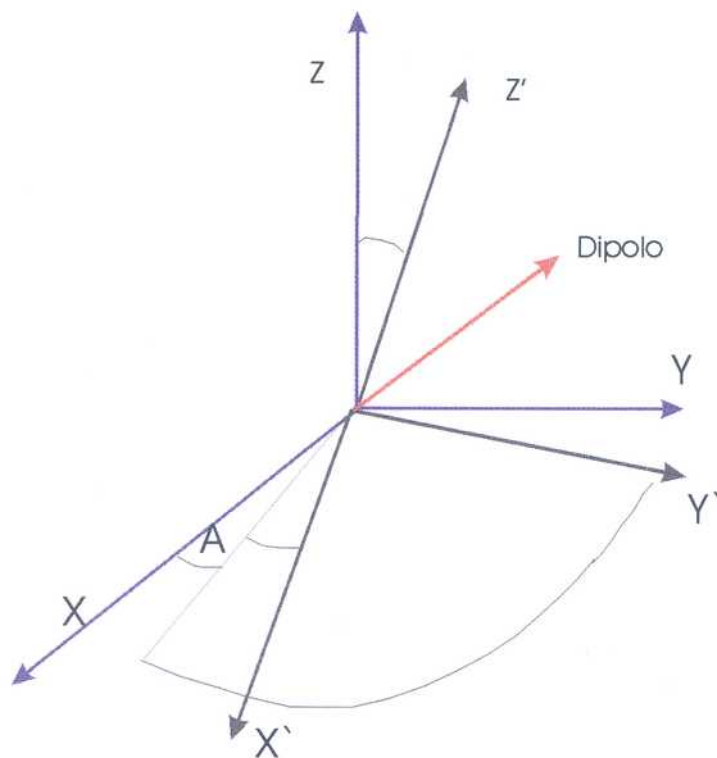


Figura 2.1: Sistemas de coordenadas  $X - Y - Z$  (sistema de laboratorio) y  $x - y - z$  (sistema fijo a la molécula) y los ángulos que definen la orientación relativa.

La ecuación de movimiento para  $u(\alpha, \beta, \gamma, t)$  será:

$$\frac{du(\alpha, \beta, \gamma)}{dt} = \varpi(t) x u(\alpha, \beta, \gamma, t) \quad (2.1)$$

donde  $\varpi(t)$  es la velocidad angular del fluoróforo en el instante  $t$ .

Teniendo en cuenta la suposición de movimiento browniano, la velocidad angular debe cumplir la ecuación de Langevin [45] del tipo:

$$I \cdot \frac{d\varpi(t)}{dt} = -\xi\varpi(t) + A(t) \quad (2.2)$$

donde  $I$  es el momento de inercia de la molécula,  $\xi$  es el tensor de fricción rotacional y  $A(t)$  representa el momento o torque producido por las colisiones entre molécula y solvente.

Supondremos que estas colisiones tienen un caracter aleatorio y por lo tanto:

$$\langle A(t) \rangle = 0 \quad \langle A(t)A(t') \rangle \propto \delta(t - t') \quad (2.3)$$

Suponemos también que en la muestra hay  $N$  moléculas fluorescentes homogéneamente distribuidas con una densidad (con respecto a la orientación) de  $n_o = \frac{N}{4\pi}$ , donde  $4\pi$  representa la normalización en el ángulo sólido.

La muestra fluorescente es excitada por un pulso de luz y ésto crea una anisotropía tanto en la población de moléculas excitadas como en la de las no excitadas. Luego de la excitación, y debido al movimiento browniano de rotación, la anisotropía inicial producida en la población de moléculas excitadas difunde hacia la situación de equilibrio.

Como la molécula tiene sólo dos niveles, el fundamental y el excitado, y despreciamos otros caminos alternativos tanto para la excitación, como para la emisión, todas las moléculas se desexcitan a través de la emisión de fluorescencia.

Llamamos  $n_e(\Omega, t)$  a la densidad de moléculas excitadas y  $n_f(\Omega, t)$  a la densidad de moléculas en el estado fundamental. La densidad de fluoróforos en la muestra antes de toda excitación es  $n_o$ .

Supondremos que se cumple en todo momento la condición:

$$n_f(\Omega, t) + n_e(\Omega, t) = n_o \quad (2.4)$$

Y por lo tanto se verifica:

$$\int_{\Omega} (n_f(\Omega, t) + n_e(\Omega, t)) d\Omega = N \quad (2.5)$$

La condición 2.4 es una primera aproximación del problema real, ya que estamos suponiendo que, tanto las moléculas excitadas, como las no excitadas, tendrán el mismo movimiento de rotación y por lo tanto los mismos tiempos de difusión.

El tratamiento analítico de la difusión rotacional, se puede hacer en forma análoga al caso de la difusión por translación. En primer lugar definimos el operador de rotación infinitesimal  $L$ , similar al operador momento angular definido en mecánica cuántica utilizando el gradiente rotacional  $\nabla_{\Omega}$ :

$$L = -i\nabla_{\Omega} = -i\nabla_u x u \quad (2.6)$$

Así definido, el gradiente tiene en cuenta las variaciones producidas sólo por rotaciones infinitesimales. El vector  $u$  es el definido anteriormente ( figura 2.1 )

Con este gradiente podemos definir, en forma análoga al caso del movimiento browniano de translación, un vector de flujo del proceso de reorientación de las moléculas como:

$$J = \mathbf{D} \cdot \nabla_{\Omega} n(\alpha, \beta, \gamma) \quad (2.7)$$

donde  $\mathbf{D}$  representa las componentes del tensor de difusión, y  $n(\alpha, \beta, \gamma)$  puede representar tanto la densidad de moléculas excitadas como las que se encuentran en el estado fundamental.

Es importante aclarar que, si bien el operador  $L$  es idéntico tanto para  $n_e(\alpha, \beta, \gamma)$  como para  $n_f(\alpha, \beta, \gamma)$ , el tensor de difusión no es en principio el mismo. Esta diferencia se debe a que la interacción soluto-solvente, en principio, no es la misma para la molécula en el estado excitado y en el estado fundamental. En este trabajo despreciaremos esta diferencia y supondremos, en todos los casos, que el movimiento de difusión y por lo tanto



los tiempos característicos resultantes, son iguales en los dos casos. Esta suposición está implícita en la condición 2.4.

La ecuación de continuidad para el caso de rotación se puede escribir como:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = L \cdot \mathbf{D} \cdot L n \quad (2.8)$$

Los coeficientes de difusión pueden definirse como:

$$\mathbf{D}_{ij} = \int_0^t \langle \varpi_i(0) \varpi_j(t) \rangle dt \quad (2.9)$$

Supondremos en todos los casos que podemos elegir el sistema fijo a la molécula de forma que en ese sistema el tensor difusión es diagonal.

Para los casos donde el coeficiente de fricción cumple la condición  $\xi_i t \gg 1$  la definición se reduce a [14]:

$$\mathbf{D}_{ij} = \frac{kT}{\xi_i} \quad i = j \quad (2.10)$$

$$\mathbf{D}_{ij} = 0 \quad i \neq j \quad (2.11)$$

En este trabajo consideraremos los casos en que las moléculas absorbentes son de forma esférica o elipsoidal y tienen un momento dipolar de absorción  $\mu$  que tendrá una orientación con el eje de polarización dada por los ángulos  $\alpha, \beta$  y  $\gamma$  de acuerdo a la definición dada en 2.1. Debido a la suposición de muestra homogénea, los ángulos deben cumplir:

$$0 \leq \beta \leq \pi, 0 \leq \alpha, \gamma \leq 2\pi.$$

La excitación se produce con un haz linealmente polarizado en un eje que tomaremos siempre como el eje **Z** en el sistema de laboratorio. Supondremos en primer lugar que el haz de excitación es un pulso en forma de delta de Dirac con una energía total que llamaremos  $a$ .

O sea que la intensidad del pulso incidente será:

$$I(t) = a\delta(t - t_o) \quad (2.12)$$

La ecuación de evolución que proponemos para la población de moléculas excitadas es [53]:

$$\frac{\partial}{\partial t} n_e(\Omega, t, K, \Phi, \tau) = K(\mu \cdot \mathbf{Z})^2 n_f(\Omega, t, K, \Phi, \tau) - \frac{n_e(\Omega, t, K, \Phi, \tau)}{\tau} + H n_e(\Omega, t, K, \Phi, ) \quad (2.13)$$

La expresión para  $n_e$  tiene dependencia con  $\Omega = (\alpha, \beta, \gamma)$  de acuerdo a la definición dada en la figura 2.1,  $t$  es el tiempo medido a partir de la primera excitación,  $K$  es un factor que depende de la energía de excitación y cuya definición se da en 2.14,  $\Phi$  representa los tiempos de difusión rotacional, y  $\tau$  es el tiempo de fluorescencia.

El segundo miembro de la ecuación tiene tres términos. El primero corresponde a la excitación de la muestra, el segundo corresponde al decaimiento por fluorescencia, y el último término tiene en cuenta la rotación difusional.

En el primer término, el factor  $K$  depende de la intensidad del pulso incidente  $I(t)$  a través de la expresión:

$$K = \sigma \rho \frac{I(t)}{A h \nu} \quad (2.14)$$

donde  $\sigma$  es la sección eficaz de absorción del fluoróforo,  $\rho$  es la eficiencia cuántica que asumimos cercana a 1,  $\nu$  es la frecuencia de excitación y  $A$  es el área de enfoque del haz incidente.

Debido a la suposición inicial de una molécula con sólo dos niveles el decaimiento por fluorescencia es monoexponencial.

En el tercer término  $H$  representa el operador de difusión que en su forma más general y de acuerdo a 2.8 es:

$$H = \sum_{i,j} \mathbf{L}_i D_{ij} \mathbf{L}_j \quad (2.15)$$

donde  $D_{ij}$  son las componentes del tensor difusión y  $\mathbf{L}$  es el operador momento angular. Más adelante se darán las expresiones para casos particulares suponiendo una forma determinada de la molécula.

Como estamos suponiendo que la excitación es una delta podemos resolver la ecuación 2.13 separando la excitación, de la evolución posterior del sistema, asumiendo que durante la excitación el decaimiento por fluorescencia y la difusión son despreciables. De esta forma se puede obtener la población de moléculas excitadas en un instante inmediatamente posterior a la excitación ( $t = 0^+$ ).

$$n_e(\Omega, t = 0^+, K) = n_o [1 - \exp - (K (\mu \cdot \mathbf{Z})^2)] \quad (2.16)$$

A lo largo de todo este trabajo supondremos que el valor de  $K$  es chico, tomando como cota superior:

$$K \leq 0.1$$

Si tomamos como valor típico para la sección eficaz de las muestras:  $\sigma = 10^{-16} \text{cm}^2$ , y  $\rho = 1$  obtenemos, a partir de 2.14 una intensidad  $I \leq 65 \frac{\text{MW}}{\text{cm}^2}$ , suponiendo un pulso de 1 ps. de duración con una longitud de onda de 532 nm. Esto corresponde a una potencia media de 650 mW. para pulsos con una repetición de 100 MHz.

Si hacemos un desarrollo en serie en  $K$  de la expresión 2.16, y conservamos solo los términos hasta segundo orden, obtenemos:

$$n_e(\Omega, t = 0^+, K) = n_o \left[ K (\mu \cdot \mathbf{Z})^2 - \frac{1}{2} K^2 (\mu \cdot \mathbf{Z})^4 \right] \quad (2.17)$$

Integrando en todo el ángulo sólido tenemos que la fracción de moléculas excitadas será:

$$\frac{n_e(t = 0^+)}{n_o} = \frac{2\pi}{15} (10K - 3K^2) \quad (2.18)$$

Que corresponde para  $K = 0.1$  a una fracción del 3% sobre el total de la muestra.



## 2.3 Ecuación de difusión

Una vez que la muestra es excitada el sistema decae por fluorescencia, pero al mismo tiempo hay un proceso de difusión rotacional. Para describir esta evolución resolvemos 2.13 pero ahora sin el término de excitación.

Existen varios métodos para resolver este proceso de difusión [7], en este trabajo seguiremos la teoría presentada por Favro [22] y extendida luego por otros autores [28], [26]. La ecuación a resolver es:

$$\frac{\partial}{\partial t} n_e(\Omega, t, K) = -H n_e(\Omega, t, K) \quad (2.19)$$

Esta ecuación es análoga a la ecuación de Shoedinger para un rotor rígido asimétrico. En su trabajo, Favro et al, demuestra que un método conveniente para la resolución es el de la función de Green. Aplicándola para este caso podemos expresar a la población de moléculas excitadas como:

$$n_e(\Omega, t, K) = \int_{\Omega} n_e(\Omega_o, t = 0^+, K) G(\Omega_o/\Omega, t) d\Omega_o \quad (2.20)$$

donde  $G(\Omega_o/\Omega, t)$  es la función de Green que describe la rotación del sistema de moléculas excitadas, suponiendo que en el instante  $t = 0^+$  teníamos una población dada por  $n_e(\Omega_o, t = 0^+, K)$  que evolucionará en el instante  $t$  a  $n_e(\Omega, t, K)$ .

La función de Green puede ser desarrollada en términos de las autofunciones del rotor rígido asimétrico para el caso más general. Como en este trabajo analizaremos sólo los casos en que el fluoróforo tiene forma esférica o elipsoidal podemos simplificar la expresión para la función  $G(\Omega_o/\Omega, t)$  y expresarla en función de las autofunciones del rotor simétrico. De esta forma podemos escribir a la función de Green como:

$$G(\Omega_o/\Omega, t) = \sum_{lkm} C_{lkm} \exp(-E_{lkm}t) \quad (2.21)$$



En esta expresión los coeficientes se definen como  $C_{lkm} = \Psi_{lkm}^*(\Omega_o) \Psi_{lkm}(\Omega)$

Donde  $\Psi_{lkm}(\Omega)$  representa las autofunciones mencionadas, y  $E_{lkm}$  sus autovalores

Después de separar la parte temporal, la ecuación a resolver es:

$$(D_1 \mathbf{L}_1^2 + D_2 \mathbf{L}_2^2 + D_3 \mathbf{L}_3^2) \Psi_{lm} = E_{lm} \Psi_{lm} \quad (2.22)$$

Donde  $D_1, D_2, D_3$  son los elementos diagonales del tensor de difusión, y  $\mathbf{L}_i$  representa las componentes del operador momento angular según la definición dada por Rose [42].

De esta forma la expresión para la evolución temporal de la población de moléculas excitadas será, utilizando 2.20, 2.21 y 2.22 :

$$n_e(\Omega, t, K) = \sum_{lkm} a_{lkm}(K) \Psi_{lkm}(\Omega) \exp(-E_{lkm}t) \quad (2.23)$$

donde los coeficientes  $a_{lkm}$  se obtienen como:

$$a_{lkm} = \int_{\Omega_0} n_e(\Omega_o, t = 0^+, K) \Psi_{lkm}^*(\Omega_o) d\Omega_o \quad (2.24)$$

Teniendo en cuenta la expresión 2.17 los coeficientes  $a_{lkm}$  tendrán un término lineal y un término cuadrático en  $K$ . O sea que, la expresión para  $n_e(\Omega, t, K)$  será suma de términos de orden 1 y orden 2 en  $K$ .

### 2.3.1 Excitación con el segundo pulso.

El segundo pulso llega a la muestra en el instante  $t_o$ . Por simplicidad suponemos que el segundo pulso es idéntico al primero, esto es, una delta con energía  $a$ . La intensidad total de excitación es entonces :

$$I(t) = a\delta(t) + a\delta(t - t_o) \quad (2.25)$$

En todo momento supondremos que  $t_o < \tau$  y  $t_o < \Phi$  donde  $\Phi$  representa el tiempo característico de difusión rotacional. Para este rango de tiempos el segundo pulso encontrará la muestra modificada respecto a la que encontró el primer pulso de excitación, y esta diferencia tiene dos contribuciones :

1-En primer lugar, al tener menor densidad de moléculas en el estado fundamental, la fluorescencia producida por la excitación del segundo será menor. Esto es debido a que hay todavía moléculas excitadas por el primer pulso. Esta diferencia depende del tiempo de fluorescencia del fluoróforo y no está relacionada con la difusión de las moléculas excitadas.

2- El otro factor se debe a que en la segunda excitación la muestra ya no es homogénea como sucedía cuando fué excitada con el primer pulso.

Como los pulsos de excitación están linealmente polarizados la no homogeneidad en la muestra se traduce en una disminución en la población de moléculas excitadas. La idea fundamental de la técnica es utilizar estas diferencias para, a través del estudio de la fluorescencia en función del retardo, obtener información del tiempo de fluorescencia y del tiempo de difusión rotacional del fluoróforo.

Después de la excitación con el segundo pulso la población de moléculas excitadas será:

$$n_e(\Omega, t = t_o^+, K) = (n_o - n_e(\Omega, t = t_o^-, K)) \left[ K (\mu \cdot \mathbf{Z})^2 - \frac{1}{2} K^2 (\mu \cdot \mathbf{Z})^4 \right] + n_e(\Omega, t = t_o^-, K) \quad (2.26)$$

En esta expresión el primer término corresponde a las moléculas excitadas por el segundo pulso, el segundo corresponde a las moléculas que fueron excitadas por el primer pulso y todavía no decayeron al estado fundamental en el instante  $t_o$ .

Podemos escribir 2.26 como:

$$n_e(\Omega, t = t_o^+, K) = n_o \left[ K (\mu \cdot \mathbf{Z})^2 - \frac{1}{2} K^2 (\mu \cdot \mathbf{Z})^4 \right] - n_e(\Omega, t = t_o^-, K) \left[ K (\mu \cdot \mathbf{Z})^2 - \frac{1}{2} K^2 (\mu \cdot \mathbf{Z})^4 \right] + n_e(\theta, \phi, t = t_o^-, K) \quad (2.27)$$

En 2.27 la población de moléculas excitadas resulta ser suma de tres términos. El primero es idéntico a la expresión 2.16, obtenida para la primera excitación, el segundo término depende sólo de la población remanente del primero y representa las moléculas que dejan de ser excitadas por el segundo pulso debido a que hubo una excitación previa. Esto significa que la cantidad de moléculas excitadas por el segundo pulso disminuye a medida que es menor el retardo entre pulsos. El tercer término coincide con el segundo de la expresión anterior (2.26) y corresponde a las moléculas excitadas por el primer pulso, que todavía no decayeron al estado fundamental.

Llamaremos desde ahora población diferencial ( $n_d$ ), a la densidad de moléculas excitadas determinada por el segundo término en la ecuación 2.27. O sea que:

$$n_d(\Omega, t = t_o, K) = n_e(\Omega, t = t_o^-, K) \left[ K (\mu \cdot \mathbf{Z})^2 - \frac{1}{2} K^2 (\mu \cdot \mathbf{Z})^4 \right] \quad (2.28)$$

La población diferencial tiene en cuenta la diferencia entre la "cantidad" de moléculas excitadas por el primer pulso, y la cantidad excitada por el segundo, asumiendo que los dos pulsos son idénticos. Esta diferencia depende de la velocidad de desexcitación del fluoróforo, a través del tiempo de fluorescencia, y de la difusión rotacional de acuerdo a lo ya comentado anteriormente. De esta forma podemos obtener información sobre el tiempo de difusión rotacional y el tiempo de fluorescencia estudiando sólo la evolución de la población diferencial en función del retardo.

De acuerdo a la expresión 2.23 y 2.24 la expresión  $n_e(\Omega, t = t_o^-, K)$  tendrá solamente términos lineales y cuadráticos en  $K$ . Para ser consistentes con la suposición inicial conservaremos sólo términos de orden 2 en  $K$ . Podemos entonces, redefinir la población diferencial despreciando el término  $-\frac{1}{2} K^2 (\mu \cdot \mathbf{Z})^4$  en la expresión 2.27 ya que a el producto  $n_e(\Omega, t = t_o^-, K) \frac{1}{2} K^2 (\mu \cdot \mathbf{Z})^4$  tendrá todos sus términos de orden superior. De esta forma :

$$n_d(\Omega, t = t_o, K) = n_e(\Omega, t = t_o^-, K) [K (\mu \cdot \mathbf{Z})^2] \quad (2.29)$$



A partir de esta definición, y con el mismo razonamiento utilizado para obtener la evolución de la población de moléculas excitadas, podemos estudiar la población diferencial a partir de la segunda excitación obteniendo la expresión de  $n_d(\Omega, t, K)$  en función de las autofunciones  $\Psi_{lkm}(\Omega)$  para  $t > t_o$ .

$$n_d(\Omega, t, K) = \sum_{lkm} b_{lkm}(K) \Psi_{lkm}(\Omega) \exp(-E_{lkm}t) \quad (2.30)$$

donde los coeficientes  $b_{lkm}(K)$  se obtienen en forma análoga a 2.24.

Para obtener las expresiones para  $n_d(\Omega, t, K)$  y, a partir de éstas, la intensidad y energía de fluorescencia, es necesario conocer la forma de la molécula y la ubicación de los dipolos de absorción y de emisión dentro de la misma.

Como primer paso estudiaremos la situación más sencilla que corresponde al caso de una molécula esférica donde los dipolos de absorción y emisión son coincidentes.

## 2.4 Moléculas esféricas

En esta sección trataremos el caso particular donde suponemos que la molécula es de forma esférica con un momento dipolar de absorción  $\mu$  cuya dirección viene dada por el vector  $u(\alpha, \beta, \gamma)$  definido en 2.1

Debido a la simetría que presenta la molécula son necesarios sólo dos ángulos para describir su orientación. Por esta razón utilizaremos el sistema de coordenadas polares en lugar del sistema  $\alpha, \beta, \gamma$ , con la definición usual dada por los ángulos  $\theta$  y  $\Phi$  medidos desde el sistema  $X - Y - Z$  fijo. Ver esquema en la figura 2.2.

Por la simetría que presenta la forma de excitación, ( luz linealmente polarizada en el eje  $Z$  ) no hay dependencia con el ángulo  $\Phi$  y por lo tanto, las expresiones para la población de moléculas excitadas y no excitadas tendrán dependencia sólo en  $\theta$ .

Debido a que estamos suponiendo el caso de moléculas esféricas:

$$\mu \cdot Z = \mu \cos(\theta). \quad (2.31)$$

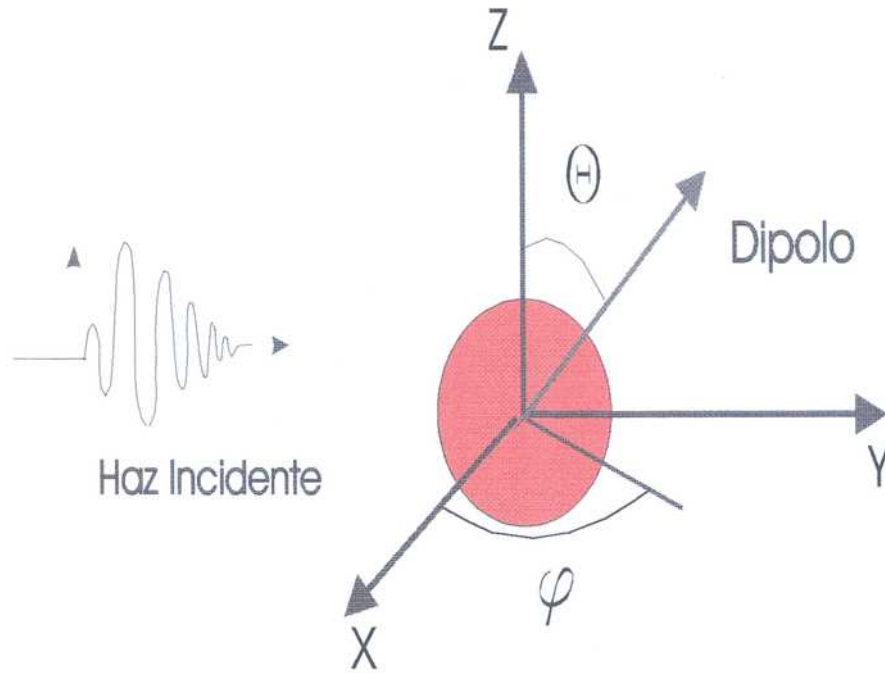


Figura 2.2: Sistema de referencia para el caso de molécula esférica

Si suponemos que el primer pulso de excitación llega a la muestra a  $t = 0$ , y dado que este pulso es una delta podemos suponer que en  $t = 0^+$  la población de moléculas excitadas será, de acuerdo a lo obtenido en 2.16:

$$n_e(\theta, t = 0^+) = n_o(1 - \exp(-K \cos^2(\theta))) \quad (2.32)$$

En esta expresión estamos asumiendo que no hay ninguna molécula en el estado excitado antes de la llegada del primer pulso a la muestra.

De acuerdo a lo obtenido en 2.26 tomamos un desarrollo a segundo orden en  $K$  con lo que la expresión 2.32 será:

$$n_e(\theta, \phi, t = 0^+, K, \Phi, \tau) = n_o(K \cos^2(\theta) - \frac{1}{2} K^2 \cos^4(\theta)) \quad (2.33)$$

Después de la excitación la ecuación de evolución de la población de moléculas excitadas está determinada sólo por los términos de difusión y de decaimiento por fluorescencia.

Luego de separar la parte temporal, la ecuación a resolver es idéntica a la ecuación de autovalores para un rotor esférico rígido. En este caso, debido a la simetría de la molécula esférica, sólo los subíndices  $l$  y  $m$  son necesarios.

Esto es :

$$L^2 \Psi_{l,m} = E_{l,m} \Psi_{l,m} \quad (2.34)$$

donde  $\Psi_{l,m}$  y  $E_{l,m}$  son las autofunciones y los autovalores del operador difusión definidos en 2.22 que además, en este caso, coinciden con los armónicos esféricos.

El desarrollo 2.23 tiene ahora una expresión más sencilla ya que, la simetría en  $Z$  que introduce la excitación con luz polarizada hace que sólo las autofunciones con  $m = 0$  tengan coeficientes no nulos. Podemos eliminar este subíndice en todas las expresiones y utilizar la notación  $\Psi_l$  y  $E_l$ .

Las expresiones para las autofunciones y los autovalores se reducen entonces a:

$$\Psi_l = A_l P_l(\cos(\theta)) \quad E_l = l(l+1)D \quad (2.35)$$

donde  $A_l$  son constantes de normalización y  $P_l(\cos(\theta))$  son los polinomios de Legendre. Dado que los tres elementos diagonales del tensor difusión 2.22 son iguales, tomamos ese valor como  $D$ , el coeficiente de difusión.

Expandiendo la expresión 2.33 en función de los  $P_l$  tenemos que para todo  $t > 0$  y antes de la llegada del segundo pulso de excitación  $t < t_0$ :

$$n_e(\theta, t) = n_o \sum_{l=0}^{\infty} C_l P_l(\cos(\theta)) \exp(-E_l t) \quad (2.36)$$

Teniendo en cuenta que sólo consideramos términos de hasta segundo orden en  $K$ , y debido a la simetría en la excitación, sólo los coeficientes  $C_l$  con valores de  $l = 0, 2, 4$  son distintos de cero.



Definimos el tiempo de difusión rotacional  $\Phi$  como:

$$\Phi = \frac{1}{6D} = \frac{1}{E_2} \quad (2.37)$$

De esta forma la expresión para la población de moléculas excitadas para un tiempo  $t > 0$ , a partir de 2.35, 2.36 y 2.37 será:

$$n_e(\theta, t) = n_0 e^{-\frac{t}{\tau}} K \left( 1/3 - \frac{K}{10} + \left( 2/3 - \frac{2K}{7} \right) P_2(\cos(\theta)) e^{-\frac{t}{\Phi}} - \frac{4}{35} K P_4 \cos(\theta) e^{-\frac{10t}{3\Phi}} \right) \quad (2.38)$$

En el gráfico 2.3 se muestra la fracción de moléculas excitadas,  $\frac{n_e}{n_o}$  en función de  $\theta$  para tres valores distintos de  $K$ . Esto correspondería a distintos valores en la energía de excitación (ver por ejemplo 2.18). La fracción de moléculas excitadas llega a un valor máximo cuando el dipolo es paralelo o antiparalelo a la dirección de polarización del haz incidente ( $\theta = 0$  o  $\theta = \pi$ ). Este valor es similar al valor de  $K$  según se muestra en el gráfico 2.3.

### Excitación con el segundo pulso

Cuando el segundo pulso llega a la muestra en un instante que llamaremos  $t_0$ , siguiendo el mismo razonamiento de 2.16, la población de moléculas excitadas será suma de dos términos. El primero, al que llamaremos  $n_1$ , constituido por las moléculas que todavía permanecen en el estado excitado debido a la excitación con el primer pulso, y el segundo al que llamaremos  $n_2$ , el de las moléculas excitadas con el pulso retrasado. En todo momento supondremos que  $t_0 \leq \tau$  o sea que el retardo entre pulsos es menor al tiempo de fluorescencia.

Esto significa que inmediatamente después de la segunda excitación tendremos:

$$n_2(\theta, t = t_0^+) = (n_o - n_e(\theta, t = t_0^-))(1 - \exp(-K * \cos^2(\theta))) \quad (2.39)$$

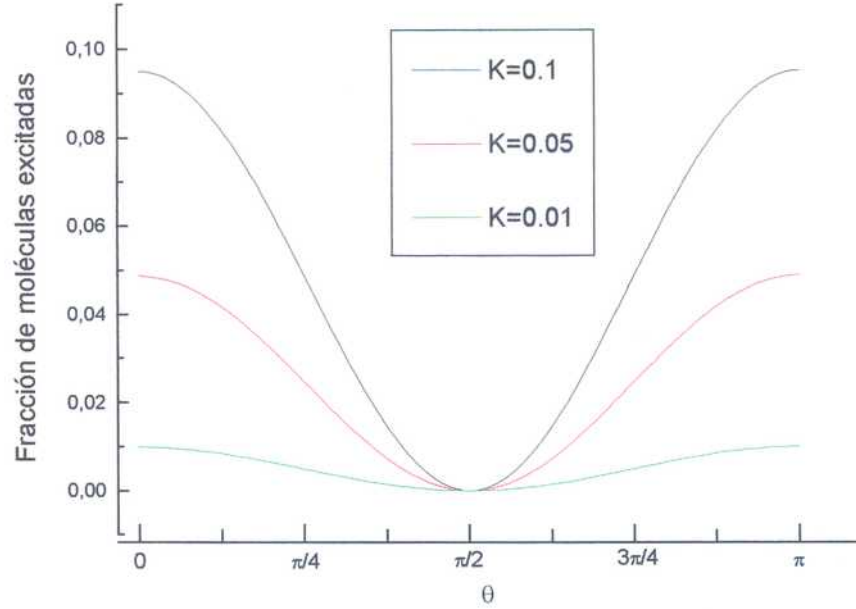


Figura 2.3: Fracción de moléculas excitadas en función del ángulo  $\theta$  para distintos valores de  $K$ .

donde  $n_2$  representa la población total de moléculas excitadas sólo por el segundo pulso. De esta forma la cantidad de moléculas excitadas después del doble pulso esta dada por:

$$n_e(\theta, t) = n_2(\theta, t) + n_1(\theta, t) \quad (2.40)$$

Y esta expresión vale para todo  $t > t_o$ .

Para ser consistentes desarrollamos a segundo orden en  $K$  la expresión 2.40 y volvemos a aplicar un desarrollo como el de la expresión 2.36 obtenemos:

$$n_e(\theta, t) = n_o K e^{(-\frac{t-t_o}{\tau})} \left( \left( \frac{1}{3} - \frac{K}{10} \right) (1 + e^{(-\frac{t}{\tau})}) - \frac{4K}{45} e^{-t_o(\frac{1}{\tau} + \frac{1}{\Phi})} - \frac{K}{9} e^{-\frac{t_o}{\tau}} \right) \quad (2.41)$$

$$+ \left( \left( \frac{2}{3} - \frac{2K}{7} \right) (1 + e^{(-\frac{t}{\tau})}) - \frac{2K}{9} e^{-\frac{t_o}{\tau}} - \frac{22K}{63} e^{-t_o(\frac{1}{\tau} + \frac{1}{\Phi})} \right) P_2(\cos(\theta)) e^{-\frac{t-t_o}{\Phi}} \\ + \left( -\frac{4K}{35} (1 + e^{(-\frac{t}{\tau})}) - \frac{8K}{35} e^{-t_o(\frac{1}{\tau} + \frac{1}{\Phi})} \right) P_4(\cos(\theta)) e^{-\frac{10}{3} \frac{t-t_o}{\Phi}} \quad (2.42)$$



De acuerdo a lo discutido en la sección anterior, la idea central para la obtención del tiempo de difusión rotacional se basa en las diferencias entre las moléculas excitadas por el primer pulso y las excitadas por el segundo pulso. Estas diferencias están dadas exclusivamente, por la evolución de las moléculas que no fueron excitadas por el segundo pulso, en el instante  $t_o$ , por estar en el estado excitado .

Utilizando la definición dada en 2.28 la población diferencial  $n_d(\theta, t)$  en el instante que llega el segundo pulso, y siempre en el caso particular de moléculas esféricas, tiene la siguiente expresión:

$$n_d(\theta, t = t_o^+) = n_e(\theta, t = t_o^-) \left[ K (\cos(\theta))^2 - \frac{1}{2} K^2 (\cos(\theta))^4 \right] \quad (2.43)$$

Haciendo el desarrollo a segundo orden en  $K$ , siempre a  $t = t_o$ , y reemplazando 2.41 en 2.43 resulta :

$$n_d(\theta, t = t_o^+) = n_o \exp(-\frac{t_o}{\tau}) K^2 \left( \frac{1}{3} + \exp(-\frac{t_o}{\Phi}) \cos(\theta)^4 + \frac{1}{3} \exp(-\frac{t_o}{\Phi}) \cos(\theta)^2 \right) \quad (2.44)$$

Una comparación entre la densidad de moléculas que se encuentran en el estado "diferencial " (en  $t = t_o$ ), con la densidad de moléculas en el estado excitado después de la primera excitación ( $t = 0$ ), da una idea clara de la relación entre la energía de fluorescencia producida por cada pulso y la energía diferencial, de la que se espera obtener los tiempos de difusión. Para eso calculamos el cociente entre la densidad de moléculas en la población diferencial y la densidad en el estado excitado. Llamaremos  $F$  al resultado de este cociente:

$$F(K, \tau, \Phi) = \frac{\int_{\Omega} n_d(\theta, t = t_o^+)}{\int_{\Omega} n_e(\theta, t = 0)} = \frac{2}{3} K \frac{(4 \exp(-\frac{t_o}{\Phi}) + 5)}{10 - 3K} \exp(-\frac{t_o}{\tau}) \quad (2.45)$$

En esta expresión se ve que el cociente  $F$  tiende a cero cuando el retardo es mucho mayor que el tiempo de fluorescencia ( $\tau$ ) independientemente del valor del tiempo de difusión ( $\Phi$ ). Esto significa que todos los procesos de difusión rotacional con tiempos mayores que

$\tau$  no podrán ser medidos con esta técnica. Este resultado es razonable, teniendo en cuenta que estamos obteniendo la información de la fluorescencia

Otro hecho importante es que, debido a la condición de  $K \leq 0.1$ , el cociente  $F(K, \tau, \Phi)$  es prácticamente proporcional a  $K$  y, por lo tanto, a la energía de los pulsos de excitación. En el gráfico 2.4 se muestra la distribución angular de la población diferencial para distintos valores en el instante de la segunda excitación ( $t_o$ ).

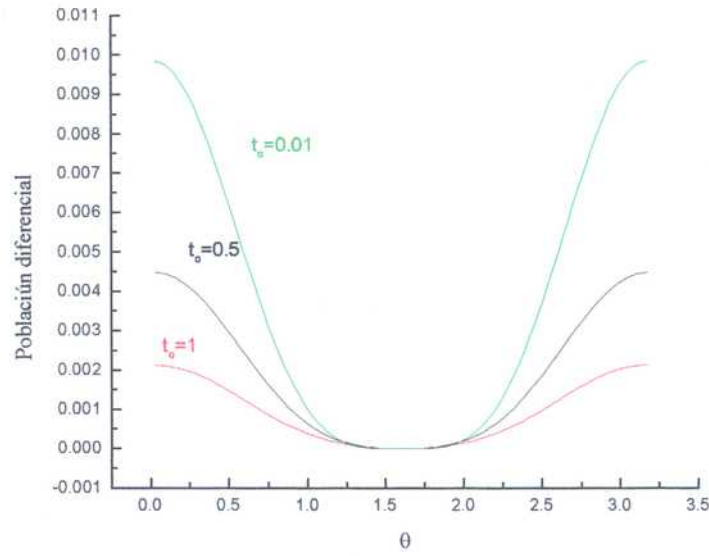


Figura 2.4: Población diferencial en función del ángulo  $\theta$  para distintos retardos entre pulsos. Se tomaron como parámetros  $\tau = 10$  y  $\Phi = 1$ .

Si aplicamos el desarrollo 2.30 con las mismas autofunciones y autovalores de 2.36 obtenemos la expresión para la población diferencial para  $t \geq t_o$ :

$$\begin{aligned}
 n_d(\theta, t) = & n_o K^2 \exp\left(\frac{t_o}{\tau}\right) \left( \frac{1}{9} + \frac{4}{45} \exp\left(-\frac{t_o}{\Phi}\right) + \left(-\frac{11}{63} + \frac{11}{21} \cos(\theta)^2\right) \exp\left(-\left(\frac{t}{\Phi}\right)\right) \right) \\
 & n_o K^2 \exp\left(\frac{t_o}{\tau}\right) \left( \left(\frac{1}{3} \cos(\theta)^2 - \frac{1}{9}\right) \exp\left(-\frac{t-t_o}{\Phi}\right) \right) + \\
 & n_o K^2 \exp\left(\frac{t_o}{\tau}\right) \left( +\left(\frac{3}{35} + \cos(\theta)^4 - \frac{6}{7} \cos(\theta)^2\right) \exp\left(-\left(\frac{10}{3} \frac{t-t_o}{\Phi} + \frac{t_o}{\Phi}\right)\right) \right)
 \end{aligned} \quad (2.46)$$

## 2.5 Expresiones para las intensidades de fluorescencia

A partir de la expresión 2.46, y siempre suponiendo que la excitación se produce con un haz polarizado en el eje  $Z$ , podemos calcular la intensidad de la fluorescencia emitida en una dirección de polarización dada por el versor  $\hat{\xi}$ . Tomamos los ángulos  $\theta'$  y  $\phi'$  para fijar la dirección de  $\hat{\xi}$ , de acuerdo al esquema que se muestra en la figura 2.5.

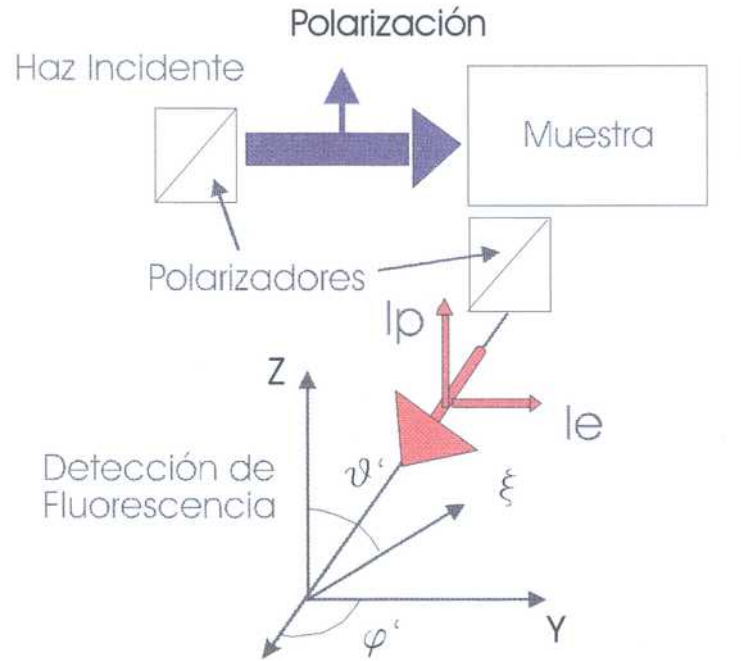


Figura 2.5: Detección de fluorescencia polarizada en dirección ortogonal a la de excitación.

En el sistema en que estamos trabajando será:

$$\hat{\xi} = (\sin(\theta') \cos(\phi'), \sin(\theta') \sin(\phi'), \cos(\theta')) \quad (2.47)$$

De esta manera obtenemos la intensidad de fluorescencia en una dirección perpendicular a la dirección de excitación a través de la expresión:

$$I(t) = \frac{1}{\tau} \int_0^\infty \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) (\hat{\xi} \cdot \hat{\rho})^2 n(\theta, t) d\Omega \quad (2.48)$$

donde el versor  $\hat{\rho}$  es el que fija la orientación de las moléculas que aparecen en el integrando dadas por  $n(\theta, \phi, t)$  y por lo tanto:

$$\hat{\rho} = (\sin(\theta) \cos(\phi), \sin(\theta) \sin(\phi), \cos(\theta)) \quad (2.49)$$

Para simplificar el cálculo supondremos que  $\hat{\xi}$  se encuentra en el plano  $YZ$  (ver figura 2.2) y por lo tanto tomaremos en todos los casos  $\phi' = \frac{\pi}{2}$ .

Desarrollando para este caso la expresión 2.48, y teniendo en cuenta que por la simetría de la excitación la población de moléculas excitadas no depende de  $\phi$ , la expresión general para la intensidad de fluorescencia es:

$$I(t) = \frac{1}{\tau} \int_{\Omega} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \left( \sin^2(\theta') \sin^2(\phi) \sin^2(\theta) + \cos^2(\theta') \cos^2(\theta) \right) n(\theta, t) d\Omega \quad (2.50)$$

Llamaremos  $I_p(t)$  (Intensidad paralela) a la intensidad de fluorescencia obtenida cuando  $\hat{\xi} \parallel Z$ , y  $I_e(t)$  (Intensidad perpendicular) a la intensidad obtenida cuando  $\hat{\xi} \perp Y$  y la excitación es producida con un solo pulso.

De acuerdo a estas definiciones:

$$I_p(t) = \frac{1}{\tau} \int_{\Omega} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \cos^2(\theta) n(\theta, \phi, t) d\Omega \quad (2.51)$$

y:

$$I_e(t) = \frac{1}{\tau} \int_{\Omega} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \sin^2(\theta) \sin^2(\phi) n(\theta, \phi, t) d\Omega \quad (2.52)$$

Siguiendo el mismo razonamiento llamaremos en adelante  $E_e$  y  $E_p$  a las energías de fluorescencia paralela y perpendicular obtenidas cuando la excitación se realiza con un solo pulso.

Si en las expresiones 2.51 y 2.52 reemplazamos  $n(\theta, \phi, t)$  por la población diferencial  $n_d(\theta, \phi, t)$  obtenemos lo que llamaremos la intensidad diferencial  $Id_p$  y  $Id_e$ .



## 2.6 Expresiones para la energía diferencial

A partir de la intensidad de fluorescencia, podemos obtener la expresión para la energía de fluorescencia integrando en el tiempo. La integral se obtiene tomando como tiempo inicial el instante de la segunda excitación. De esta forma calculamos sólo la energía de fluorescencia que llamamos diferencial.

De la misma forma que para las intensidades, elegimos como dirección de polarización a los ejes  $Y$  y  $Z$  y llamamos energía diferencial perpendicular  $Ed_e$ , y energía diferencial paralela  $Ed_p$  a las energías obtenidas con los respectivos ejes de polarización, de acuerdo con las siguientes definiciones:

$$Ed_p = \int_{t_0}^{\infty} Id_p(t, t_0) dt \, d\nu \qquad Ed_e = \int_{t_0}^{\infty} Id_e(t, t_0) dt \, d\nu \quad (2.53)$$

Las expresiones 2.53 correspondientes al caso de moléculas esféricas son:

$$Ed_p = \frac{4}{945} n_0 \frac{K^2}{\tau + \phi} \pi \exp\left(-\frac{t_0}{\tau}\right) \left( 35\tau + 63\phi + 28\tau \exp\left(-\frac{t_0}{\phi}\right) + 72\phi \exp\left(-\frac{t_0}{\phi}\right) \right) \quad (2.54)$$

y

$$Ed_e = \frac{4}{945} n_0 \frac{K^2}{\tau + \phi} \pi \exp\left(-\frac{t_0}{\tau}\right) \left( 35\tau + 21\phi + 28\tau \exp\left(-\frac{t_0}{\phi}\right) + 6\phi \exp\left(-\frac{t_0}{\phi}\right) \right) \quad (2.55)$$

Para tener una idea de la magnitud de la energía diferencial de fluorescencia comparada con la fluorescencia total, definimos las energías normalizadas haciendo el cociente de la energía diferencial, con la energía de fluorescencia que produciría la excitación con un solo pulso.

Llamaremos  $En_p$  a la energía normalizada, polarizada en forma paralela al eje de excitación,  $En_e$  para el caso polarizado en forma perpendicular.

$$En_p = \frac{Ed_p}{E_p} \qquad En_e = \frac{Ed_e}{E_e}$$

donde  $E_p$  y  $E_e$  son las energías obtenidas excitando con un solo pulso.

En los gráficos 2.6 y 2.7 se muestran las curvas de  $En_p$  y  $En_e$  en función del retardo entre pulsos para distintos valores del cociente  $\frac{\phi}{\tau}$ .

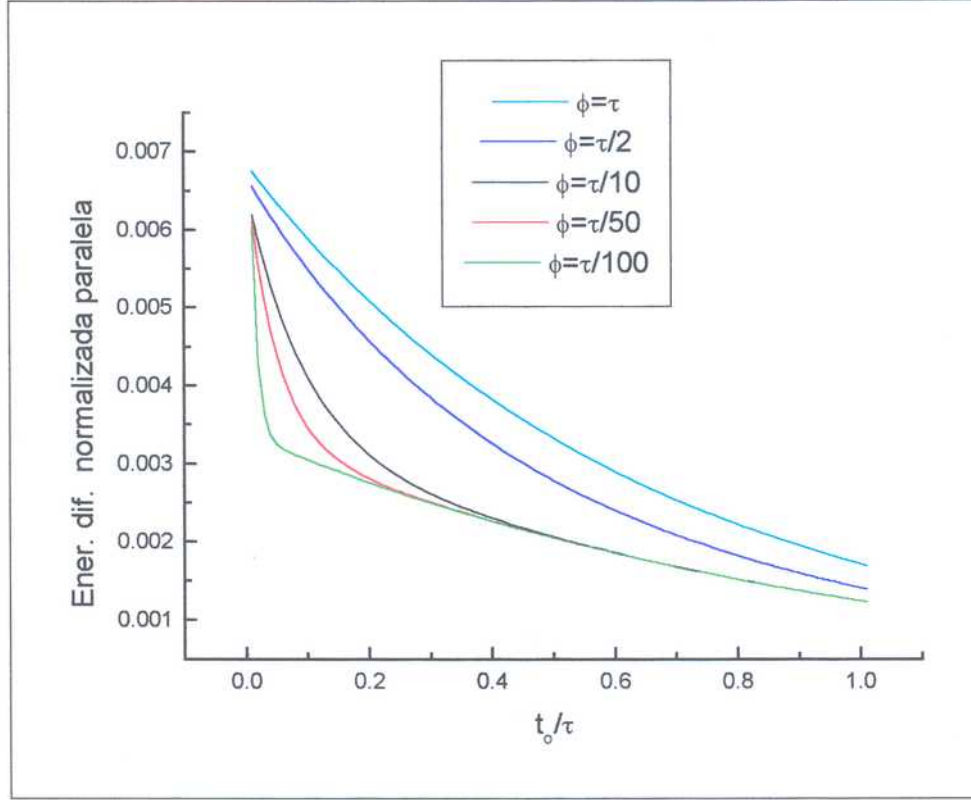


Figura 2.6: Energía diferencial normalizada paralela al eje Z ( $E_{dnp}$ ) para distintos valores de la relación  $\frac{\phi}{\tau}$

En todos los casos las curvas de energía diferencial se obtuvieron con  $K = 0.01$ .

Según se muestra en los gráficos 2.6 y 2.7, los valores máximos para esta energía se obtienen para retardos cercanos a cero. La razón está en que, cuanto menor sea el retardo entre pulsos, mayor será la anisotropía presente en la muestra que encuentra el segundo pulso de excitación, y por lo tanto mayor la diferencia entre la energía de fluorescencia producida por el primer pulso y la energía producida por el segundo. La energía diferencial es precisamente, ésta diferencia. De acuerdo a las figuras 2.6, 2.7, los valores máximos, corresponden al 0.7% de la energía de fluorescencia que se obtendría con un solo pulso de excitación.

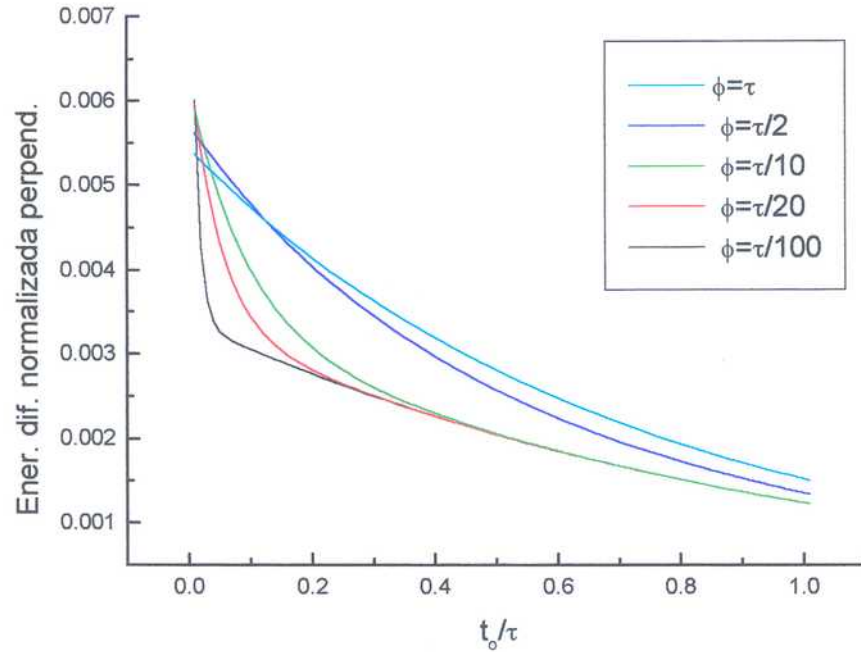


Figura 2.7: Energía diferencial normalizada perpendicular al eje  $Z$  ( $E_{dne}$ ) para distintos valores de  $\frac{\phi}{\tau}$ .

Se observa también que para los casos donde se cumple la relación  $\frac{\phi}{\tau} < \frac{1}{10}$ , las curvas muestran un decaimiento rápido en la energía diferencial, que corresponde a la difusión rotacional, seguido por un decaimiento lento que corresponde a la fluorescencia. Puede observarse que, bajo esta condición, el proceso de difusión es menos afectado por el decaimiento por fluorescencia.

En el caso inverso en que  $\frac{\phi}{\tau} \geq \frac{1}{10}$  ambos procesos, difusión y decaimiento por fluorescencia, ocurren en tiempos similares y el comportamiento biexponencial es menos evidente.

### Sensibilidad

Para hacer una estimación de la sensibilidad del método, calculamos la variación de  $Ed_p$  y  $Ed_e$  con el tiempo de difusión.

Definimos:

$$Sd_p = \frac{\partial E d_p}{\partial \phi} \quad \text{y} \quad Sd_e = \frac{\partial E d_e}{\partial \phi}$$

En los gráficos 2.8 y 2.9, se muestran los valores de  $Sd_p$  y  $Sd_e$  en función del retardo para distintos valores de  $\frac{\phi}{\tau}$ .

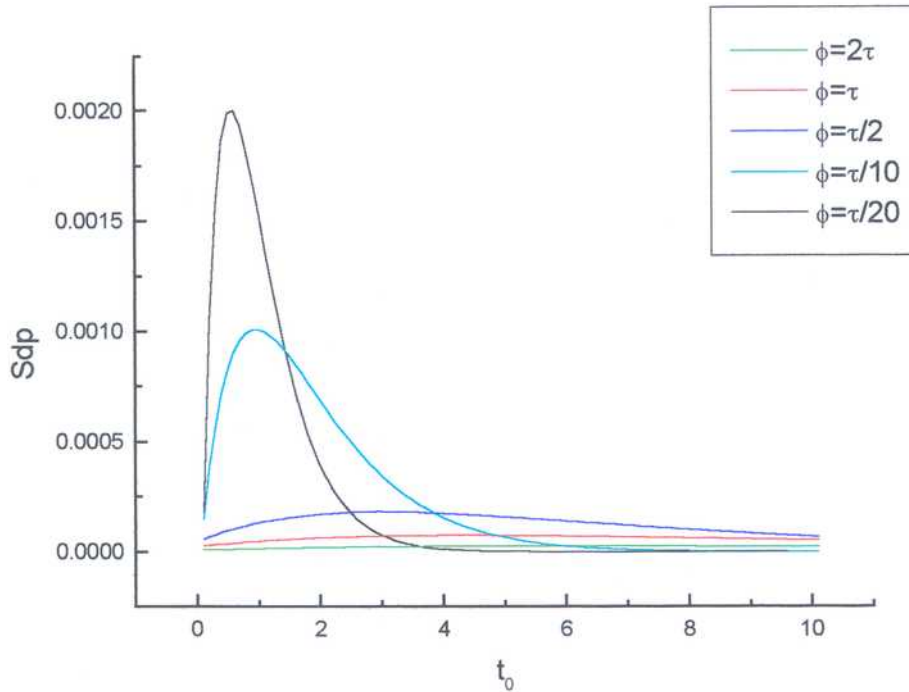


Figura 2.8: Sensibilidad en función del retardo para la energía diferencial paralela. Se tomaron distintos valores de  $\frac{\phi}{\tau}$ .

A partir de estas curvas, se puede observar que la sensibilidad de la energía diferencial aumenta cuando el cociente  $\frac{\phi}{\tau}$  disminuye. Los casos típicos de interés son principalmente aquellos donde los tiempos de rotación son cortos, por debajo del nanosegundo, mientras que los tiempos típicos de fluorescencia se encuentran entre 1 y 10 nanosegundos.

También surge de estos gráficos que, para los casos en que  $\phi > \tau$ , la sensibilidad tiende a cero y la técnica deja de ser útil. Esto se debe, a que la fluorescencia no puede tener información del movimiento de difusión si su tiempo característico es mayor a  $\tau$ .



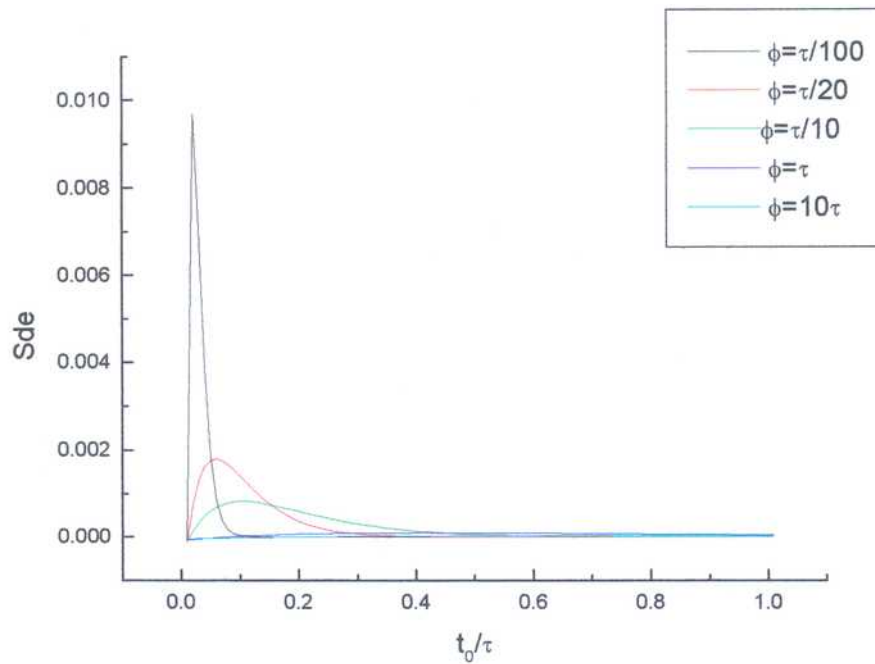


Figura 2.9: Sensibilidad en función del retardo para la energía diferencial perpendicular, tomando distintos valores de  $\frac{\phi}{\tau}$

Para evaluar los valores de  $\frac{\phi}{\tau}$  que optimizan la técnica, la figura 2.10 muestra el cociente entre sensibilidad y energía diferencial para el caso en que la polarización es paralela. Idénticos resultados se obtienen para el caso de polarización perpendicular.

En el gráfico 2.10 se puede observar que el cociente sensibilidad/energía diferencial alcanza su valor máximo cuando el retardo es cercano al valor del tiempo de rotación, además este valor crece cuando el cociente  $\frac{\phi}{\tau}$  disminuye.

### 2.6.1 Energía diferencial total

Cuando la detección de la fluorescencia polarizada se hace de acuerdo al esquema de la figura 2.5, la energía de fluorescencia total será:

$$E_t = E_x + E_y + E_z = E_p + 2E_e \quad (2.56)$$

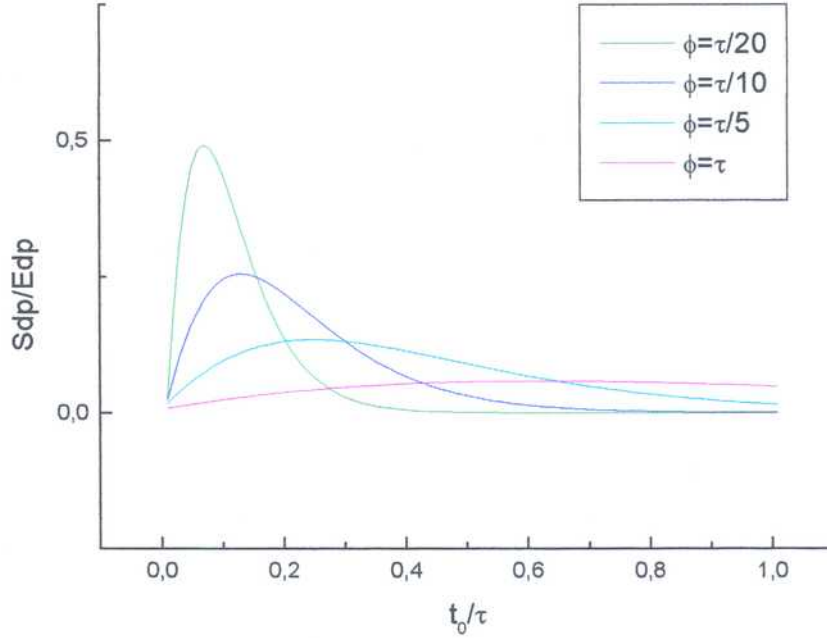


Figura 2.10: Cociente entre sensibilidad y energía diferencial para el caso en que la polarización es paralela, tomando distintos valores de  $\frac{\phi}{\tau}$ .

donde llamamos  $E_x, E_y, E_z$  a la fluorescencia polarizada a lo largo de cada eje, según 2.5. Debido a la simetría en el eje  $Z$  de excitación, se cumple:  $E_x = E_y = E_e$  es la energía de fluorescencia perpendicular, mientras que  $E_z = E_p$  es la energía de fluorescencia paralela. Por otro lado, si la detección de la fluorescencia se realiza en una dirección arbitraria de polarización dada por el vector  $\xi$ , (figura 2.5) la expresión para esta dada por:

$$E_{\xi} = \sin^2(\theta')E_p + \cos^2(\theta')E_e$$

En el caso particular en el cual la detección se realiza con un polarizador donde  $\xi$  cumple la condición:  $2 \sin^2(\theta') = \cos^2(\theta')$ , la energía de fluorescencia será proporcional a  $E_t$ . En este caso, se dice que la dirección de polarización está en ángulo mágico, y corresponde en nuestro esquema a un ángulo  $\theta' = 54.7^\circ$ .

Extendiendo este razonamiento, llamaremos energía diferencial de fluorescencia total (

$Ed_t$ ) a :

$$Ed_t = \frac{1}{3}(Ed_p + 2Ed_e) \quad (2.57)$$

Para el caso de molécula esférica se obtiene la expresión:

$$Ed_t = \frac{4}{45}\pi K^2 n_0 \exp\left(-\frac{t_0}{\tau}\right) \left(5 + 4 \exp\left(-\frac{t_0}{\phi}\right)\right) \quad (2.58)$$

En el gráfico 2.11 se muestra el comportamiento de  $Ed_t$  en función del retardo para distintos valores del cociente  $\frac{\phi}{\tau}$ .

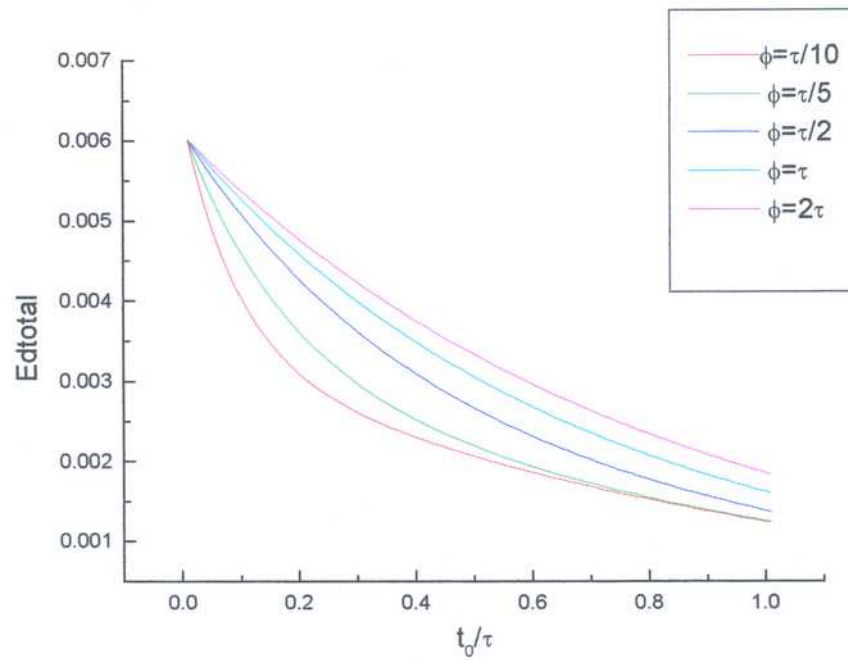


Figura 2.11: Energía diferencial total para distintos valores de  $\frac{\phi}{\tau}$

La energía diferencial total presenta una ventaja importante con respecto a las definidas anteriormente ya que los valores de los coeficientes que multiplican a las exponenciales (ver 2.58) no dependen de  $\tau$  ni de  $\phi$ . En las expresiones 2.54 y 2.55 en cambio esta dependencia sí aparece.

La eliminación de la dependencia con  $\Phi$  y  $\tau$  en los coeficientes, se consigue en otras técnicas ( single photon counting [2] , up-conversion [44] ), haciendo dos mediciones y calculando la anisotropía de fluorescencia ( la diferencia entre la intensidad de fluorescencia en dirección paralela y perpendicular ) [7], [2]. En este caso solo es necesaria una medición para poder realizar el ajuste.

### 2.6.2 Energía diferencial sin polarizar

Una alternativa interesante a las planteadas, es la de realizar la detección sin polarizar la fluorescencia. En este caso y suponiendo siempre un esquema de detección como el de 2.5, la expresión de la energía de fluorescencia no polarizada que llega al detector es:

$$Ed_{sp} = Ed_p + Ed_e \quad (2.59)$$

$$Ed_{sp} = \frac{8}{945} \pi n_o \frac{K^2}{\phi + \tau} \left( (39\phi + 28\tau) \exp(-t_o(\frac{1}{\phi} + \frac{1}{\tau})) + (42\phi + 35\tau) \exp(-\frac{t_o}{\tau}) \right) \quad (2.60)$$

Este tipo de medición representa una simplificación importante en el esquema experimental ya que es eliminado el polarizador en la detección de fluorescencia [35].

### 2.6.3 Comparación entre las distintas energías diferenciales

A partir de las expresiones 2.53, 2.55, 2.58 ,2.60 se puede observar que la energía diferencial tiene una dependencia exponencial con los tiempos de fluorescencia y rotación. Las curvas en todos los casos son suma de dos términos exponenciales, uno con un tiempo de decaimiento  $(\frac{1}{\phi} + \frac{1}{\tau})^{-1}$  y el otro con un tiempo  $\tau$ .

Es interesante destacar que en los casos donde el tiempo de difusión es mucho menor que el de fluorescencia ( $\phi < \frac{\tau}{10}$ ) el término de decaimiento por fluorescencia es prácticamente constante para los retardos del orden de  $\phi$ . Esto hace que la curva sea prácticamente una monoexponencial y facilita el ajuste para obtener  $\phi$ .

Según se obtiene de la expresión 2.58, en el caso extremo en que  $\tau \rightarrow \infty$ , la señal de energía diferencial total cae de su valor máximo (obtenido a retardo cero), al 50% cuando



$t_o \approx \phi$ . Esto se evidencia en el gráfico 2.12 donde se muestran las dos contribuciones (fluorescencia y difusión) por separado y el resultado final que es la energía diferencial total en función del retardo.

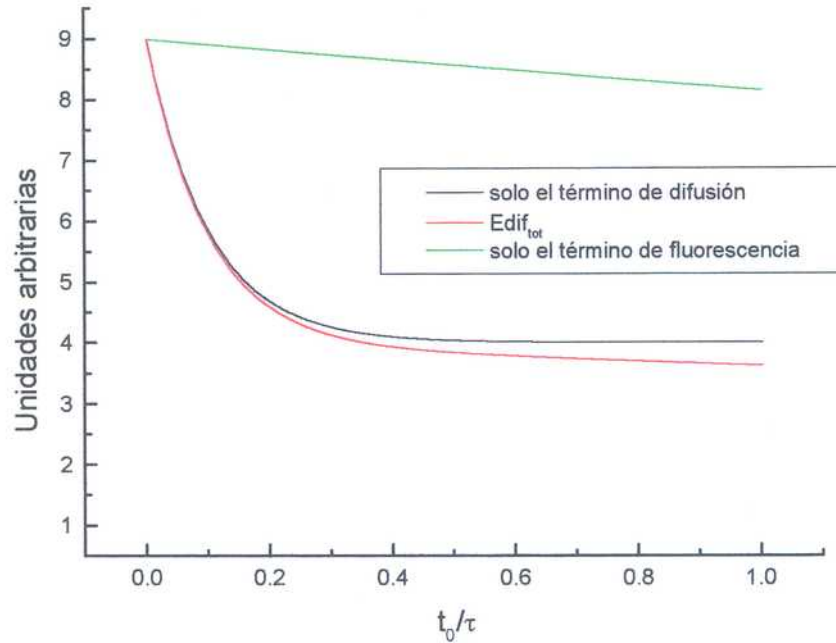


Figura 2.12: Se muestran por separado las contribuciones a la energía diferencial del factor de fluorescencia, el factor de difusión y el producto de ambas que es la  $Ed_{tot}$

En este caso se tomó  $\phi = \frac{\tau}{100}$ . El valor del término de  $Ed_t$  cae al 51% de su valor máximo cuando  $t_o = \phi$ .

En los tres casos presentados ( $Ed_p, Ed_e, Ed_t$ ), la medición de la energía diferencial permite la obtención del tiempo de difusión con una sola medición, si se conoce el tiempo de fluorescencia. En particular el caso de  $Ed_t$  presenta la particularidad, ya mencionada, de que los coeficientes que multiplican a las exponenciales no dependen de  $\phi$  y  $\tau$ .

Por otro lado, hay una limitación siempre presente en ésta técnica y es que, sólo en los casos en que el tiempo de difusión es del mismo orden, o menor al tiempo de fluorescencia, las mediciones serán posibles. De lo contrario la sensibilidad del método baja

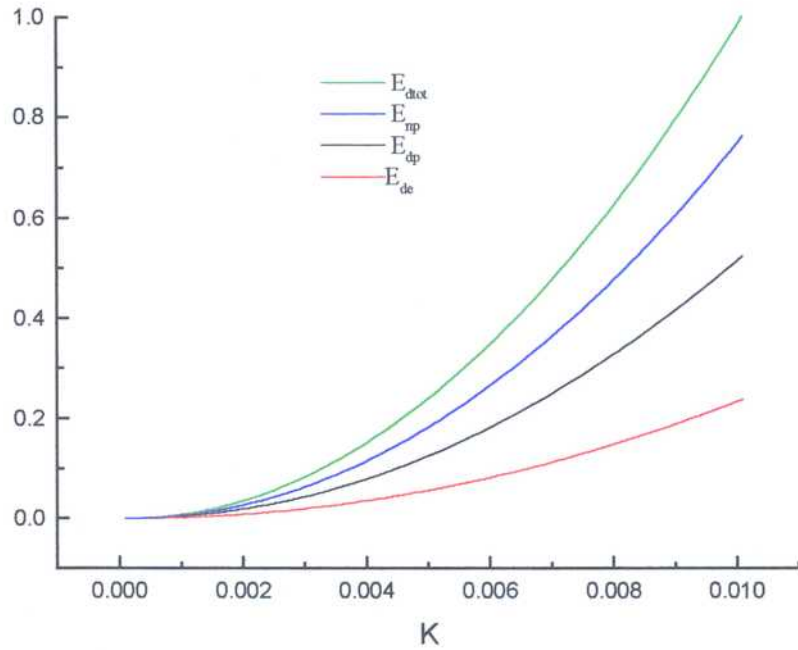


Figura 2.13: Comparación entre los valores máximos de  $Ed_p$ ,  $Ed_e$ ,  $Ed_t$ ,  $Ed_{np}$  en función de  $K$  (proporcional a la energía de excitación).

En el gráfico 2.13 se muestran los valores máximos para la energía diferencial paralela ( $Ed_p$ ), energía diferencial perpendicular ( $Ed_e$ ), energía diferencial total ( $Ed_t$ ), y energía diferencial no polarizada ( $Ed_{np}$ ) en función del parámetro  $K$ .

Se supone que en todas las curvas, tanto la muestra como los parámetros del pulso de excitación son los mismos. Todos los valores graficados se calcularon inmediatamente después de la segunda excitación, y están normalizados con el valor máximo que corresponde a  $Ed_t$  para  $K = 0.01$

En el gráfico 2.14 se muestran las curvas de energía diferencial normalizadas con la energía de fluorescencia que se obtendría con un solo pulso. Los valores de estos cocientes se graficaron en función de  $K$ .

A partir de este gráfico se observa que, la razón entre energía diferencial y la energía de

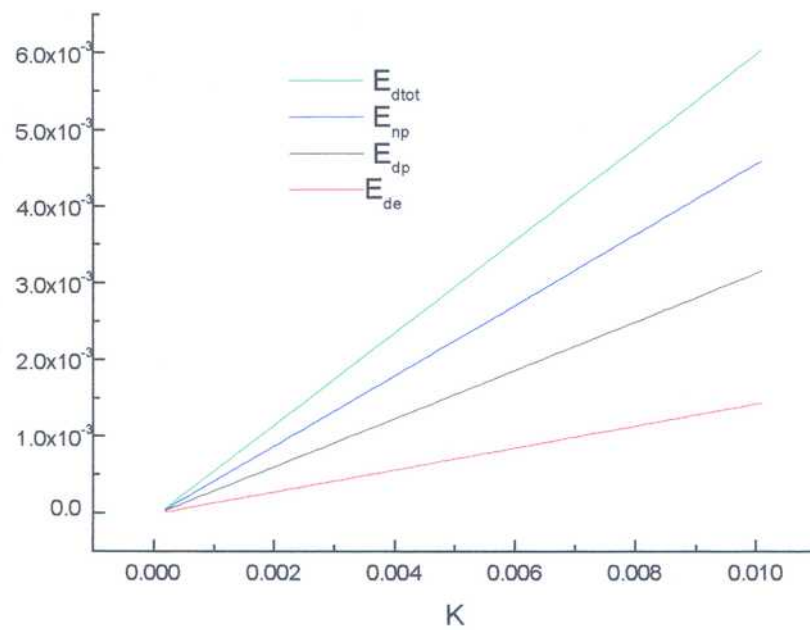


Figura 2.14: Relación entre los valores máximos de energía diferencial con la energía de fluorescencia (con un solo pulso) en función de  $K$ .





## Capítulo 3

### Moléculas elipsoidales

En este capítulo nos ocuparemos del caso de una molécula elipsoidal, con un eje de simetría no degenerado.

En esta caso elegimos un sistema de referencia fijo a la molécula ( $x, y, z$ ) y otro fijo en el laboratorio ( $X, Y, Z$ ), tal como se muestra en la figura 3.1.

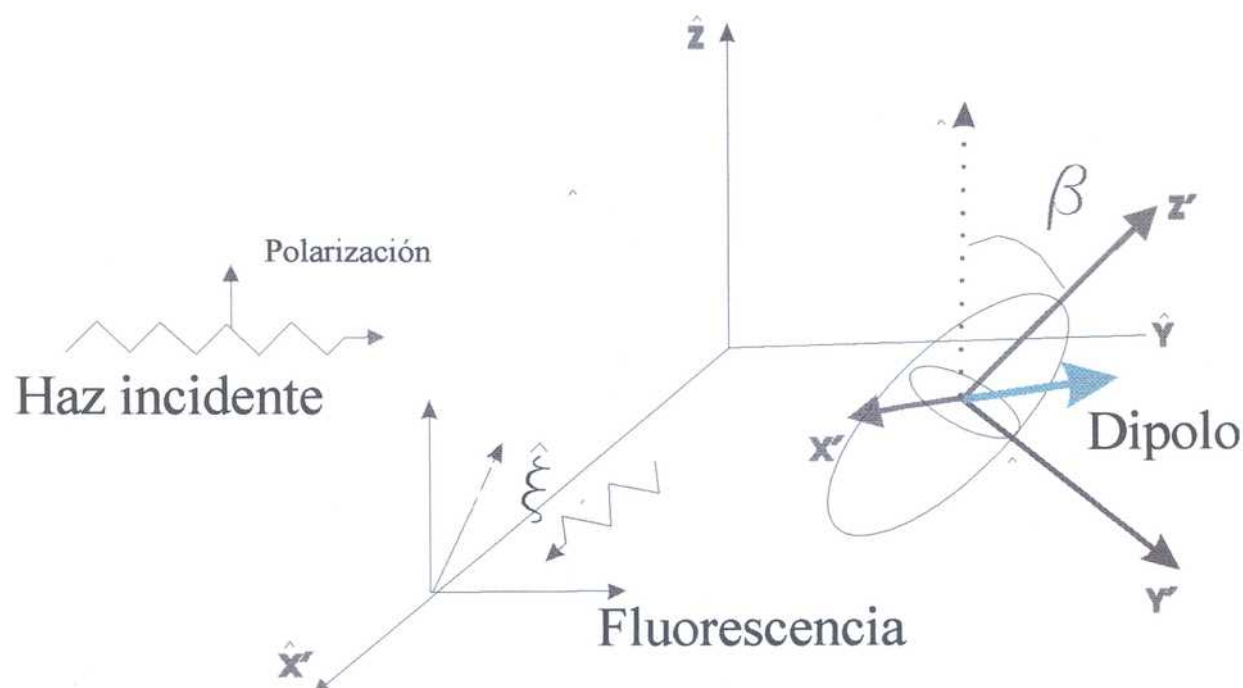


Figura 3.1:

Suponemos que cada molécula en la muestra tiene un momento dipolar dado por  $\mu$ , de

$$\mu = \mu_x x + \mu_y y + \mu_z z \quad (3.1)$$

Será útil para el desarrollo que sigue, definir las componentes en una base esférica a través de la transformación:

$$\begin{aligned} \mu^{+1} &= -\sqrt{\frac{1}{2}}(\mu_x + \mu_y i) & \mu^{-1} &= \sqrt{\frac{1}{2}}(\mu_x - \mu_y i) & \mu^0 &= \mu_z \end{aligned} \quad (3.2)$$

Para cualquier vector  $V$  la relación entre las componentes en esta base, en el sistema de laboratorio y el sistema fijo a la molécula, está dada por:

$$V_{mol}^k = \sum_{m=-1}^{+1} D_{1mk}(\alpha, \beta, \gamma) V_{lab}^m \quad (3.3)$$

donde  $D_{lmk}(\alpha, \beta, \gamma)$  son los elementos de la matriz de rotación utilizando la convención de Rose [42] y  $\alpha, \beta, \gamma$  representan los ángulos de Euler según la definición común [42].

En esta base, el producto escalar común entre dos vectores  $V$  y  $W$  se escribe como:

$$V \cdot W = V_x W_x + V_y W_y + V_z W_z = \sum_{m=-1}^{+1} (-1)^m V^m W^{-m} \quad (3.4)$$

### 3.1 Excitación de la muestra

Describamos con este formalismo la absorción de un fotón por un fluoróforo en la muestra que, según lo descrito en 2.13, es proporcional al cuadrado del producto escalar entre el eje de polarización del haz incidente y el momento dipolar de absorción. Utilizando la relación 3.4 tenemos que:

$$(\mu \cdot Z)^2 = \sum_{m=-1}^{+1} \sum_{n=-1}^{+1} D_{10m}(\Omega) D_{10n}(\Omega) \mu^{-m} \mu^{-n} \quad (3.5)$$

Esta expresión permite describir el caso general, en el que el dipolo de absorción tiene cualquier orientación dentro de la molécula.

En este trabajo se consideraron de interés dos situaciones particulares, en donde:

- i) el dipolo de absorción está orientado en el eje  $z$  de la molécula
- ii) el dipolo está en el plano de simetría ortogonal al eje  $z$ .

En el primer caso la expresión 3.5 será:

$$(\mu \cdot Z)^2 = \frac{1}{4} \mu^2 D_{100}^2(\Omega) = \cos^2(\beta) \quad (3.6)$$

En el segundo caso podemos suponer, sin pérdida de generalidad, que el dipolo está orientado sobre el eje  $x$ . En cuyo caso el producto 3.5 será:

$$(\mu \cdot Z)^2 = \frac{1}{4} \mu^2 (D_{101}^2(\Omega) - 2D_{101}(\Omega)D_{10-1}(\Omega) + D_{101}^2(\Omega)) = \sin^2 \beta \left( \frac{1 + \cos(2\alpha)}{2} \right) \quad (3.7)$$

Los elementos de la matriz de Wigner pueden relacionarse con los armónicos esféricos en los sistemas en que hay simetría de revolución. En nuestro caso esto se cumple ya que suponemos que la excitación es paralela al eje  $Z$  del sistema de laboratorio. Esta simetría permite además eliminar la dependencia en uno de los ángulos de Euler. Por esa razón, en la expresión 3.5 todos los elementos de la matriz de Wigner involucrados tienen uno de los subíndices igual a cero.

Esto nos permite relacionar cada elemento de esta matriz con los armónicos esféricos de la siguiente forma:

$$D_{lm0}(\alpha, \beta, 0) = D_{l0-m}(0, \beta, -\alpha) = \left( \frac{4\pi}{2l+1} \right)^{\frac{1}{2}} Y_{lm}^*(\alpha, \beta) \quad (3.8)$$

Teniendo en cuenta estas propiedades podemos plantear la evolución de la población de moléculas excitadas con un pulso  $y$ , a partir de esa expresión, obtener la población

Siguiendo el razonamiento hecho para el caso general en 2.17, las expresiones para los coeficientes obtenidos en 2.23, para la población de moléculas excitadas serán :

$$a_{00} = \frac{2}{3} K \sqrt{\pi} (\mu_z + \mu_x + \mu_y) \quad (3.9)$$

$$a_{20} = \frac{2 \sqrt{5} \sqrt{\pi} K (2 \mu_z^2 - \mu_x^2 - \mu_y^2)}{15}$$

$$a_{21} = \frac{2 \sqrt{30} \sqrt{\pi} \mu_z K (\mu_x + i \mu_y)}{15}$$

$$a_{2-1} = -\frac{2 \sqrt{30} \sqrt{\pi} \mu_z K (\mu_x - i \mu_y)}{15}$$

$$a_{22} = \frac{\sqrt{30} \sqrt{\pi} K (\mu_x^2 - \mu_y^2 - 2 \mu_x \mu_y i)}{15}$$

$$a_{2-2} = \frac{\sqrt{30} \sqrt{\pi} K (\mu_x^2 - \mu_y^2 + 2 \mu_y \mu_x i)}{15}$$

Para la ecuación de difusión el operador  $H$  tiene la expresión:

$$H = D_{\parallel} L_3 + D_{\perp} (L_1^2 + L_2^2)$$

Utilizando la expresión 2.23 y aplicándola al caso particular de moléculas elipsoidales donde podemos utilizar las expresiones 3.5 y 3.8, tenemos que la población de moléculas excitadas es:

$$ne(\alpha, \beta, t) = \sum_{l=0}^2 \sum_{m=1}^1 a_{lm} Y_{lm}(\alpha, \beta) \exp(-E_{lm} t) \quad (3.10)$$



En esta expresión los autovalores  $E_{lm}$  se obtienen a partir de la relación:

$$E_{lm} = l(l+1)D_{\parallel} + (D_{\perp} - D_{\parallel})m^2 \quad (3.11)$$

Los coeficientes  $D_{\parallel}$  y  $D_{\perp}$  representan la componente paralela y perpendicular al eje  $z$  en el sistema fijo a la molécula.

Para el caso de un elipsoide con semiejes  $a, b$ , en los trabajos [9] y [7] se propone una relación simplificada entre, los coeficientes de difusión y el cociente entre semiejes. Si bien se encontró que en algunos casos la concordancia con los resultados experimentales es buena [43], esta relación no se cumple en forma general, y sólo es tomada en este trabajo como una estimación entre los tiempos de difusión del elipsoide y el tiempo de fluorescencia. Las expresiones son :

$$D_{\parallel} = \frac{3}{2}\rho \frac{(\rho - s)}{(\rho^2 - 1)} D \quad D_{\perp} = \frac{3}{2}\rho \frac{(2\rho^2 - 1)s - \rho}{(\rho^2 - 1)} D \quad (3.12)$$

Donde  $\rho$  es el cociente entre ejes, menor que 1 para moléculas en forma oblada y mayor que uno para las moléculas en forma prolada. El coeficiente  $D$  es el valor obtenido para las moléculas esféricas donde  $\Phi = \frac{1}{6D}$ .

Los tiempos de rotación difusional están relacionados con los coeficientes de difusión por la relación 3.11, tal como se mostrará en la siguiente sección. De ahí la importancia en la determinación de los coeficientes del tensor de difusión  $D$ .

Las expresiones para las intensidades de fluorescencia obtenidas con un solo pulso, en dirección paralela y perpendicular a la de polarización, tienen hasta seis términos con decaimientos exponenciales. Esto es asumiendo una molécula no simétrica [26]. La anisotropía es en este caso suma de cinco términos.

Para moléculas elipsoidales, el número de tiempos de decaimiento se reduce a tres, y estos tiempos están relacionados con los valores de  $E_{lm}$  no nulos [26]. De estos tres valores, solo dos son independientes. Esto mismo ocurre para las expresiones de la energía diferencial,

### 3.1.1 Dipolo en el eje $z$ .

En primer lugar trataremos el caso en que, el dipolo se encuentra en el eje  $z$  de la molécula. En este caso, a partir de los resultados obtenidos en 3.6 y 3.9, se observa que la dependencia en los coeficientes para la expresión de  $ne(\alpha, \beta, t, t_o)$  es idéntica al caso de moléculas esféricas.

A partir de la evolución de la población de moléculas excitadas por el primer pulso, obtenemos la población diferencial  $n_d$  utilizando la expresión 2.29. Suponiendo que en el instante  $t_o$  llega el segundo pulso de excitación, la expresión para  $n_d$  será:

$$n_d(\alpha, \beta, t, t_o) = \sum_{l=0}^2 \sum_{m=-1}^1 b_{lm} Y_{lm}(\alpha, \beta) \exp(-E_{lm}(t - t_o)) \quad (3.13)$$

Como consecuencia de la simetría en la excitación, y en la forma de la molécula, sólo los valores pares de  $l$  con  $0 \leq l \leq 4$  y  $m = 0$  dan coeficientes  $b_{lm} \neq 0$ .

$$b_{00} = \frac{K^2}{270\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) \left(5 + 6 \exp\left(-\frac{t_o}{\Phi_1}\right)\right)$$

$$b_{20} = \frac{K^2 \sqrt{5}}{1260\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) \left(7 + 11 \exp\left(-\frac{t_o}{\Phi_1}\right)\right)$$

$$b_{40} = \frac{K^2}{105\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau} + \frac{t_o}{\Phi_1}\right)$$

Los resultados obtenidos para la energía de fluorescencia son también similares, y las expresiones para la energía diferencial, tanto polarizada como total, tienen un solo tiempo de difusión que está dado en este caso por la expresión:

$$\Phi_1 = \frac{1}{\dots}$$



La expresión para la energía diferencial total es:

$$Ed_t = \frac{K^2}{270\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) \left(5 + 6 \exp\left(-\frac{t_o}{\Phi_1}\right)\right)$$

### 3.1.2 Dipolo en el plano $xy$ .

Desarrollaremos a continuación el caso en que los dipolos de absorción, y de emisión se encuentran en el plano de simetría de la molécula, es decir, ortogonal al eje  $z$ . Sin pérdida de generalidad consideraremos que los dipolos se encuentran ubicados sobre el eje  $x$ .

Una vez obtenidos los coeficientes  $a_{lm}$  y utilizando las expresiones 2.26 escribimos las expresiones para la población de moléculas excitadas para un tiempo  $t$  posterior a la excitación:

$$\begin{aligned} ne(\alpha, \beta, t) = & -\frac{K}{24\pi} - 2e^{-\frac{t}{\tau}} + 3(\cos(\beta))^2 e^{-\frac{t(1+6d\tau)}{\tau}} - e^{-\frac{t(1+6d\tau)}{\tau}} - \\ & 6(\cos(\alpha))^2 e^{-\frac{t(1+6d\tau+4e\tau)}{\tau}} + 3e^{-\frac{t(1+6d\tau+4e\tau)}{\tau}} + \\ & 6(\cos(\beta))^2 (\cos(\alpha))^2 e^{-\frac{t(1+6d\tau+4e\tau)}{\tau}} - 3(\cos(\beta))^2 e^{-\frac{t(1+6d\tau+4e\tau)}{\tau}} \end{aligned} \quad (3.14)$$

De la misma forma que en el caso anterior, obtenemos la población diferencial  $n_d$ , utilizando la expresión 2.29. Suponiendo que en el instante  $t_o$  llega el segundo pulso de excitación.

$$nd(\alpha, \beta, t, t_o) = \sum_{l=0}^2 \sum_{m=-1}^1 b_{lm} Y_{lm}(\alpha, \beta) \exp(-E_{lm}(t - t_o)) \quad (3.15)$$

donde los valores de los coeficientes distintos de cero son:

$$b_{00} = \frac{K^2}{360\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) (3 \exp(-(2D_{\parallel}t_o + 4D_{\perp}t_o)) + \exp(-6D_{\parallel}t_o) + 5)$$

$$b_{20} = -\frac{K^2\sqrt{5}}{360\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) (6 \exp(-(2D_{\parallel}t_o + 4D_{\perp}t_o)) + 5 \exp(-6D_{\parallel}t_o) + 7)$$

$$b_{2\pm 2} = \pm \frac{K^2 \sqrt{30}}{5040\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) (9 \exp(-(2D_{\parallel}t_o + 4D_{\perp}t_o)) + 2 \exp(-6D_{\parallel}t_o) + 7)$$

$$b_{40} = \frac{K^2}{840\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) (\exp(-(2D_{\parallel}t_o + 4D_{\perp}t_o)) + 2 \exp(-6D_{\parallel}t_o))$$

$$b_{4\pm 2} = \frac{K^2}{360\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) (3 \exp(-(2D_{\parallel}t_o + 4D_{\perp}t_o)) + \exp(-6D_{\parallel}t_o) + 5)$$

$$b_{4\pm 4} = \frac{K^2 \sqrt{70}}{1680\pi^{\frac{3}{2}}} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) \exp(-(6D_{\parallel}t_o + 4D_{\perp}t_o)) \quad (3.16)$$

### 3.1.3 Energía diferencial total.

A partir de 3.13 obtenemos la expresión para la intensidad diferencial de fluorescencia en dirección paralela ( $Id_p$ ), y perpendicular ( $Id_e$ ) al eje  $Z$  (paralelo al eje de polarización de la excitación). A diferencia de las expresiones obtenidas para el caso de las moléculas esféricas, las integrales sobre el ángulo sólido deben hacerse teniendo en cuenta que  $\alpha$  y  $\beta$  son ángulos de Euler y no las coordenadas polares del dipolo. De esta manera :

$$Id_p = \int_{\Omega} n_d(\alpha, \beta, t, t_o) (\mu \cdot Z)^2 d\Omega \quad (3.17)$$

$$Id_e = \frac{1}{2} \int_{\Omega} n_d(\alpha, \beta, t, t_o) [(\mu \cdot X)^2 + (\mu \cdot Y)^2] d\Omega \quad (3.18)$$

A partir de la expresiones para las intensidades obtenemos la energía diferencial paralela ( $Ed_p$ ), perpendicular ( $Ed_e$ ) y total ( $Ed_t$ ). Siguiendo la definición dada en 2.53 tenemos:

$$Ed_p = \int_0^{\infty} Id_p(t, t_o) dt \quad Ed_e = \int_0^{\infty} Id_e(t, t_o) dt \quad (3.19)$$

$$Ed_t = Ed_p + 2Ed_e \quad (3.20)$$

La expresion obtenida en este caso es :

$$Ed_t = \frac{K^2}{180\pi} \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) (5 + 3 \exp(-t_o(2D_{\perp} + 4D_{\parallel})) + \exp(-t_o 6D_{\perp})) \quad (3.21)$$

De acuerdo a lo obtenido en 3.21 la energía diferencial tiene dos tiempos característicos de difusión rotacional, a los que llamaremos  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$  y están relacionados con los elementos del tensor de difusión de acuerdo a:

$$\Phi_1 = \frac{1}{2D_{\perp} + 4D_{\parallel}} \quad \Phi_2 = \frac{1}{6D_{\parallel}} \quad (3.22)$$

En la expresión 3.21, por lo tanto, encontramos tres tiempos característicos  $\tau$ ,  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$  que determinan la forma de la curva  $Ed_t$  vs.  $t_o$ .

En los múltiples trabajos que se encuentran en la literatura [7], [2], los valores típicos para los tiempos de fluorescencia oscilan entre  $1ns$  y  $10ns$ , mientras que, los valores para los tiempos de difusión, para mediciones realizadas cerca de temperatura ambiente van desde  $1$  ps hasta  $10$  ns.[7], [2]. Por esta razón es que podemos separar claramente las curvas de energía diferencial en dos regiones: la primera corresponde al caso en el cual, el tiempo de fluorescencia es mucho mayor a los de rotación y la segunda al caso en que estos tiempos son similares.

Si utilizamos las expresiones 3.12 para obtener los valores de  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$  vemos que, para el caso prolado ( $\rho > 1$ ), a medida que aumenta la relación entre los semiejes de la molécula aumenta el cociente  $\frac{\Phi_1}{\Phi_2}$ , mientras que para el caso oblado ( $\rho < 1$ ) los tiempos tienen valores similares.

Por ejemplo para  $\rho = 1$ , resulta  $\Phi_1 \approx \Phi_2$  en los dos casos, pero cuando  $\rho = 10$  tenemos

En los gráficos 3.2 y 3.3 se muestran curvas de energía diferencial para diferentes valores de la relación  $\frac{\Phi_i}{\tau}$  ( $i = 1, 2$ ). Se tomaron tiempos de rotación entre  $\frac{1}{10}\tau$  y  $\tau$ .

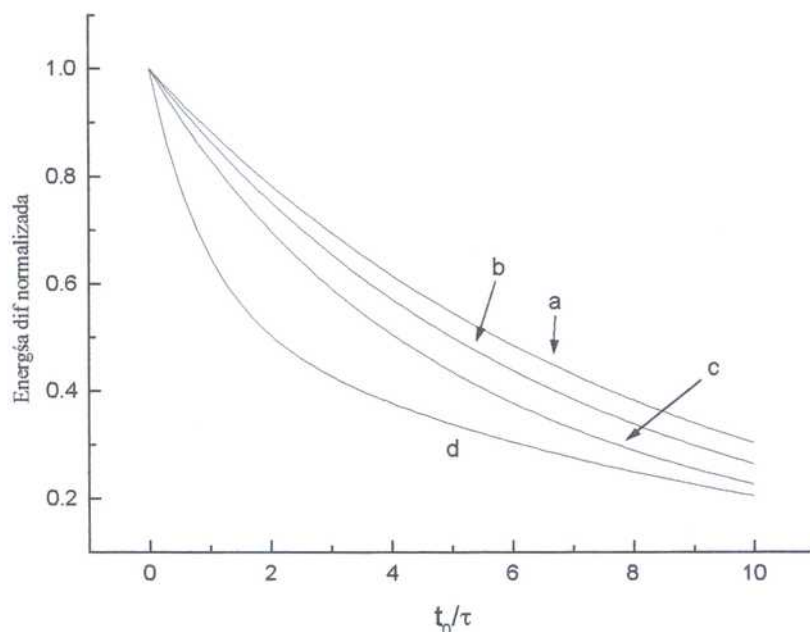


Figura 3.2: Energía diferencial en función del retardo para una molécula oblada: (a)  $\Phi_1 = \Phi_2 = 2\tau$ , (b)  $\Phi_1 = \Phi_2 = \tau$ , (c)  $\Phi_1 = \Phi_2 = \tau/2$ , (d)  $\Phi_1 = \Phi_2 = \tau/10$

Los valores de energía diferencial graficados, están normalizados con el valor máximo que se obtiene cuando el retardo es nulo.

Las diferencias entre los dos gráficos se deben a lo comentado en el párrafo anterior. En el caso oblado ( figura 3.2) los dos tiempos de difusión,  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$ , se mantienen iguales, mientras que en el caso prolado (figura 3.3 ),  $\Phi_1$  se mantiene constante y solamente  $\Phi_2$  varía.



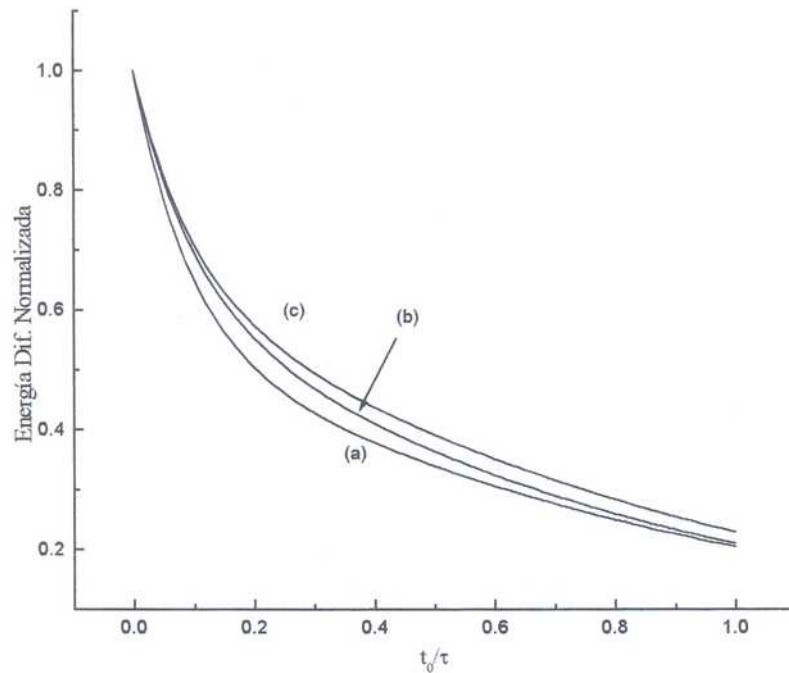


Figura 3.3: Energía diferencial en función del retardo para una molécula pro-lada. Para el caso oblado, las curvas se separan claramente para distintos valores de  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$ , mientras en el caso prolado, la diferenciación es menor. (a)  $\Phi_1 = \Phi_2 = \tau/10$ , (b)  $\Phi_1 = \tau/10$ ,  $\Phi_2 = \tau/2$ , (c)  $\Phi_1 = \tau/10$ ,  $\Phi_2 = \tau$ , (d)  $\Phi_1 = \tau/10$ ,  $\Phi_2 = 2\tau$

### 3.1.4 Energía diferencial no polarizada

En forma análoga a la definición dada en 2.60 la expresión para la energía diferencial no polarizada en este caso es:

$$Ed_{sp} = \frac{1}{\pi} K^2 \exp\left(-\frac{t_o}{\tau}\right) \left( A + B \exp\left(-\frac{t_o}{\Phi_1}\right) + C \exp\left(-\frac{t_o}{\Phi_2}\right) \right) \quad (3.23)$$

Donde:

$$A = \frac{(14 + 49D_{\parallel}\tau + 280D_{\parallel}D_{\perp}\tau^2 + 105D_{\perp}\tau + 140D_{\perp}^2\tau^2)}{(4 + \tau)(4 + \tau)}$$



$$B = \frac{(39 + 672D_{\parallel}D_{\perp}\tau^2 + 120D_{\parallel}\tau + 336D_{\perp}^2\tau^2 + 282D_{\perp}\tau)}{4\pi(1 + \frac{\tau}{\Phi_1})(1 + \frac{\tau}{\Phi_2})}$$

$$C = \frac{(13 + 224D_{\parallel}D_{\perp}\tau^2 + 44D_{\parallel}\tau + 112D_{\perp}^2\tau^2 + 90D_{\perp}\tau)}{4\pi(1 + \frac{\tau}{\Phi_1})(1 + \frac{\tau}{\Phi_2})}$$

Si bien la expresión para  $Ed_{sp}$  es más compleja en cuanto a la dependencia de los coeficientes con el tiempo de fluorescencia y los coeficientes de difusión, el comportamiento es similar al que presenta la energía diferencial total.

# Capítulo 4

## Esquema experimental

### 4.1 Breve descripción

El trabajo experimental desarrollado tuvo como objetivo principal la medición de la energía diferencial de fluorescencia después de una doble excitación en función del retardo entre pulsos. A partir de estos datos, y según la predicción del modelo, es posible obtener los tiempos de rotación difusional del fluoróforo.

Para realizar estas mediciones, se buscó que la fuente de excitación utilizada cumpliera los siguientes requerimientos: alta energía por pulso, alta repetición, ancho de pulso inferior a los tiempos a medir y longitud de onda adecuada, para que sea eficientemente absorbida por el fluoróforo. Para la muestra se tuvo en cuenta un sistema soluto-solvente con tiempos de difusión menores o iguales a los de fluorescencia, que además la molécula pudiera modelarse por una esfera o un elipsoide, y que se tratara de una molécula conocida para poder comparar los resultados obtenidos con esta técnica, con los obtenidos por otras.

El trabajo experimental realizado se puede separar en tres etapas. La primera fue llevada a cabo en el laboratorio de Electrónica Cuántica, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Bs. As. Allí se armó el láser de excitación y se montó el experimento para la detección de la fluorescencia. En esta etapa se utilizó como fuente de excitación un láser de colorantes bombeado por un láser de Nd: YAG. Este sistema presenta dos ventajas importantes: a) alta energía por pulso y b) la posibilidad de realizar

fluorescencia. Los inconvenientes que surgieron con este sistema fueron: la baja repetición del pulso de excitación (10 Hz), las fluctuaciones del láser (cercanas al 5%) y el ancho de pulso obtenido (800 ps). Este último punto requiere que los tiempos a medir sean mayores al nanosegundo. Con este sistema se obtuvieron las primeras curvas de energía diferencial en función del retardo entre pulsos, y los primeros resultados en tiempos de difusión rotacional, aunque debido a los inconvenientes mencionados los resultados experimentales presentaban una alta dispersión.

En la segunda etapa pasamos a sistemas de pulsos más cortos, mayor estabilidad en la energía por pulso y alta repetición, tratando de resolver los inconvenientes del sistema anterior. Se utilizó en primer lugar un láser de Nd:YAG con modelocking, bombeado por diodos. Este sistema fue armado en el laboratorio de Láseres de Diodos del CEILAP, en CITEFA.

Con este sistema se mejoraron considerablemente los resultados en la medición, incorporando técnicas de lockin. Se ensayaron distintas configuraciones posibles para el montaje del sistema de la línea de retardo y de la colección de fluorescencia, y se consiguió determinar los parámetros a tener en cuenta para disminuir la fluctuación en la medición de la energía de fluorescencia. Sin embargo la baja energía por pulso impidió que se consiguieran resultados satisfactorios en la medición. Por esta razón fue necesario montar el experimento con otro sistema de excitación.

En una tercera etapa se utilizó un láser de titanio-zafiro bombeado con un láser de argón. Con este esquema se mantiene la alta repetición, por lo que utilizó el mismo sistema de detección que en el caso anterior y se pudo aumentar la energía por pulso, con la ventaja adicional de tener un ancho de pulso 100 veces menor. El láser utilizado fue un sistema comercial, y el montaje del experimento se realizó en el laboratorio de Óptica Aplicada del Centro de Instrumentos de la Universidad Autónoma de México. En esta etapa, también logramos obtener curvas de energía diferencial en función del retardo y como consecuencia, resultados experimentales para tiempos de difusión rotacional en muestras líquidas.

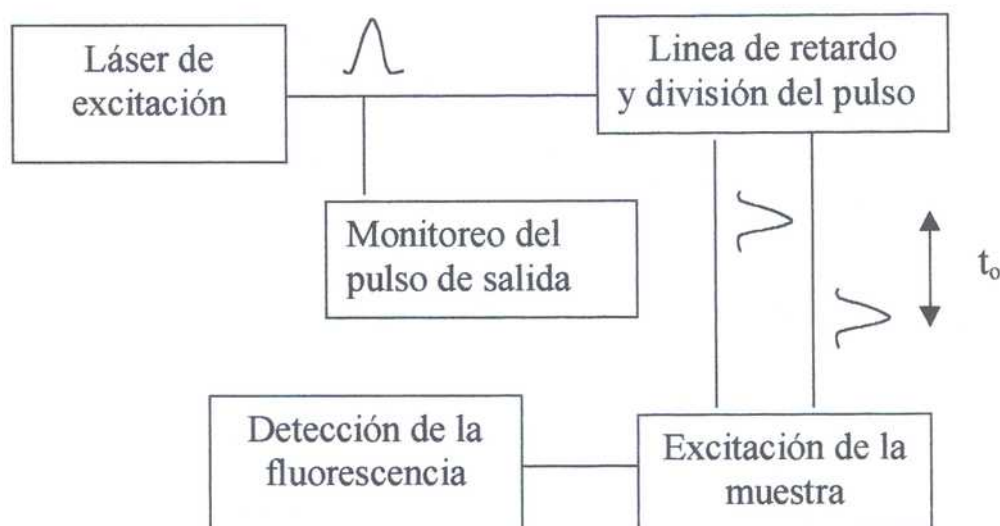


Figura 4.1: Esquema experimental general

## 4.2 Esquema general

El esquema experimental básico en todos los casos ensayados es el que se muestra en la figura 4.1 .

El pulso de excitación utilizado proviene del láser pulsado ( de acuerdo a los distintos sistemas descritos anteriormente). Con un divisor de haz se extrae una muestra del pulso para testear su estabilidad , medir su energía y ancho del pulso. Este proceso es fundamental para controlar que las características del pulso no se modifiquen durante la medición. La detección de la energía se realizó con un fotodiodo ( tiempo de respuesta en el orden del nanoseg.). Para el caso del láser de ti:zafiro se complementó con un equipo comercial ( Labmaster, Coherent) que permite medir directamente potencia media y estabilidad del pulso. El ancho de pulso se midió en todos los casos con una autocorrelación.

En la siguiente etapa, el pulso incide sobre la línea de retardo donde un divisor de haz

sobre un retrorreflector que devuelve los haces al divisor, en forma paralela al haz de entrada, en un esquema similar al utilizado en un interferómetro de Michelson. El retardo entre pulsos se controla aumentando el largo de uno de los brazos.

A la salida del divisor los dos pulsos pasan por un polarizador que define el eje  $Z$  en el experimento y luego son enfocados en la muestra para aumentar la intensidad, y en consecuencia, la fracción de moléculas excitadas. Esto es fundamental para poder realizar la medición ya que, la energía diferencial de fluorescencia es proporcional a la energía del pulso incidente.

En todos los casos la muestra utilizada fue líquida, y se colocó en una celda con cuatro caras pulidas, lo que permitió la medición de la fluorescencia en dirección perpendicular a la de excitación. Cuando se utilizaron láseres de pulsos cortos, fue necesario circular la muestra para evitar la degradación del colorante. Esto se debió al aumento de la potencia media, principalmente en el caso del titanio-zafiro donde este valor era del orden de  $10mw$ , mientras que en el láser de Nd-YAG (modelocking) la potencia media era de  $10\mu w$ , y para el láser de colorantes, solo de  $1\mu w$ .

Por último, la fluorescencia producida en la muestra fue colectada con un sistema óptico y enfocada en un detector lento para poder integrarla en el tiempo.

A continuación describiremos en detalle, las características de los sistemas montados y los resultados obtenidos con cada esquema.

### 4.3 Sistema de láser de colorantes

En este esquema se utilizó como fuente de excitación un láser de colorantes (Rodamina 6G.) con un amplificador transversal. Este sistema fue armado como parte del trabajo de la tesis, y con el mismo, se consiguieron pulsos de menos de 800 ps de ancho temporal y energías de 100 nJ.

Utilizamos como láser de bombeo un Nd-YAG que emite pulsos de 3ns de ancho temporal. La energía en cada pulso era de 200 milijoules, aunque para el bombeo se utilizó, como



### 4.3.1 Descripción general del sistema construido

En la figura 4.2 se puede observar un esquema general del sistema armado. En primer lugar el láser de bombeo (Nd:YAG) cuyo haz (línea verde en la figura), después de reflejarse en el espejo E1, llega a la cuña W1 donde una reflexión (aprox 10% de la energía total) bombea el oscilador. Allí se genera un pulso de subnanosegundos que se dirige luego hacia el amplificador.

La etapa de amplificación es bombeada por el haz de Nd:YAG, luego de una reflexión en W2. El pulso láser que se genera en el oscilador (línea amarilla en la figura), después de pasar por el amplificador, es colimado y enviado hacia el experimento.

Entre el oscilador y el amplificador se colocan tres lentes ( Le3, Le4, Le5 ) para colimar el pulso y enfocarlo en la celda que constituye el amplificador.

Finalmente en la figura 4.2 se muestra el autocorrelador que se utilizó para medir el ancho temporal del pulso generado.

#### Oscilador

En el oscilador, se genera el pulso que luego se amplificará en la siguiente etapa. Si bien se analizaron varios esquemas para construir el oscilador [48], [49], [51] se optó finalmente por una cavidad como la que se muestra en la figura 4.3.

El pulso se genera por la amplificación de la emisión espontánea, comunmente llamada ASE, producida en la celda (C1) al ser excitada por el láser de bombeo ( Nd- YAG). La celda contiene Rodamina 6G diluida en alcohol etílico, y constituye el medio activo de la cavidad.

Si el oscilador se bombea con poca energía, el ASE tiene poca intensidad y permite que se almacene energía en el oscilador. Si el bombeo es muy fuerte el ASE se hace muy intenso, y comienza a extraer la energía almacenada. Existe una zona intermedia, en que el ASE se genera con un flanco abrupto cuando se almacenó suficiente energía en el oscilador. Si en esas condiciones de bombeo, se consigue realimentar esta señal en el oscilador, de

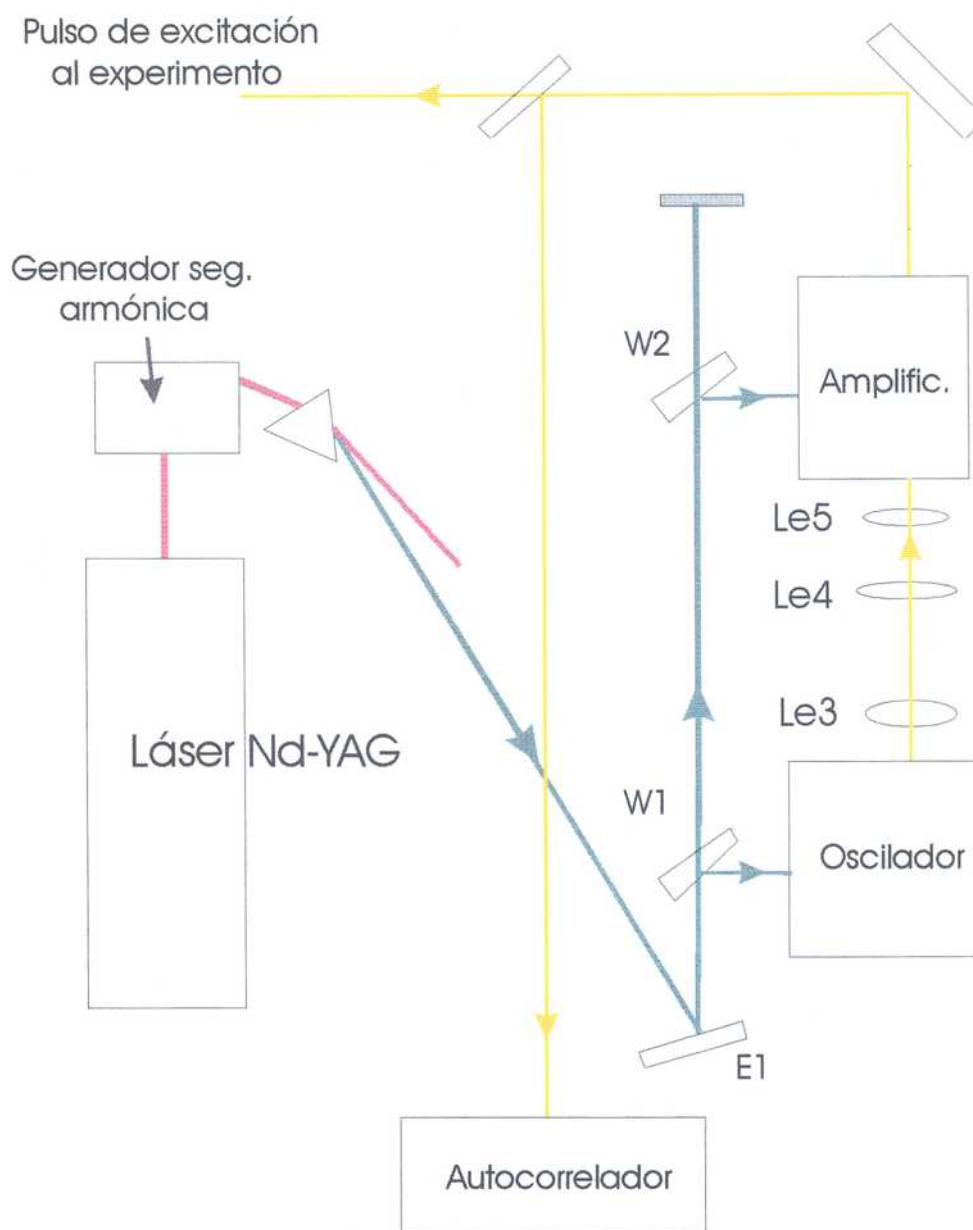


Figura 4.2: Esquema del láser de colorantes, oscilador y amplificador utilizado como fuente de excitación

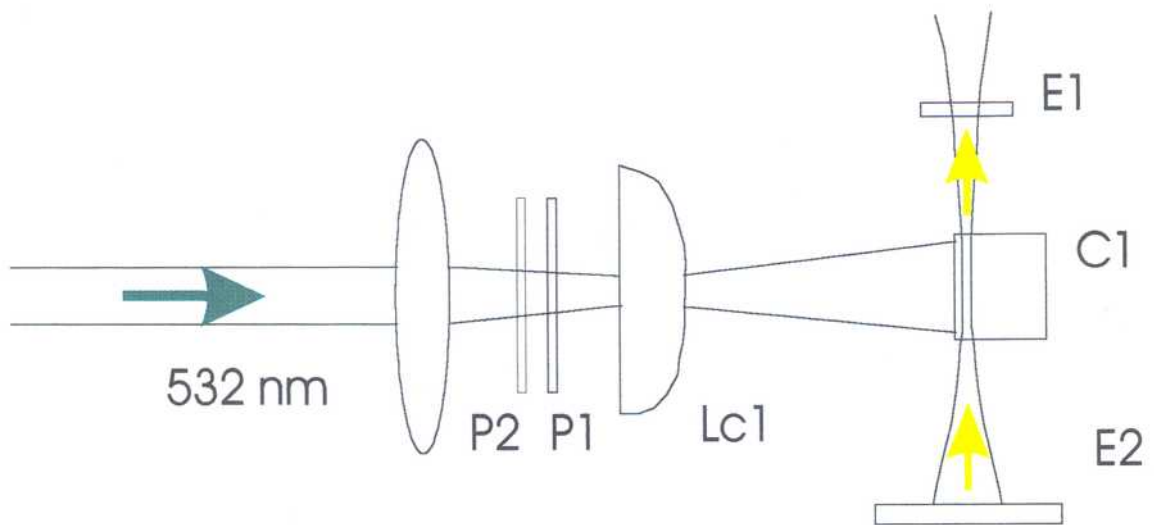


Figura 4.3: Esquema de oscilador con dos espejos, se muestra también el esquema utilizado para el haz de bombeo

a la salida del oscilador, un pulso más angosto temporalmente que el pulso de bombeo [51], [50], [52].

Se ensayaron varios esquemas en el armado de la cavidad, pero en particular hubo dos que mostraron mejores resultados. El esquema del primero se muestra en la figura 4.3.

El efecto de angostamiento del ancho de pulso, descrito anteriormente, se consiguió colocando el espejo de salida E1 a una distancia menor que la del espejo E2.

El otro arreglo ensayado fue con una cavidad similar a la anterior, pero con un solo espejo. En este esquema se intentó que la señal saturara la ganancia del oscilador realimentando una sola vez. El único espejo, de 10 cm de radio de curvatura, se colocó a una distancia de 10 cm de la celda en lugar del espejo plano E2.

En ambos casos, el bombeo se enfocó sobre el medio activo con una lente esférica LE1 y una cilíndrica LC1. La combinación de lentes, define el tamaño de la zona excitada en la celda de colorante (C1), que constituye la zona activa del oscilador.

Con los polarizadores P1 y P2 se controló la potencia de bombeo que es un parámetro crítico para angostar el pulso. Se observó que para bombeos altos el pulso obtenido a

encontraba cerca del umbral se conseguía el efecto de angostamiento del ancho de pulso. Las mediciones de ancho de pulso se hicieron con un fotodiodo rápido y con un auto-correlador. En los dos esquemas ensayados, se consiguió un ancho de pulso menor a 800 ps.

### Amplificador Transversal

El amplificador transversal se puede apreciar en la figura 4.4 donde se muestra que el haz de bombeo se hace incidir sobre la celda a través de la cuña W2 (ver figura 4.2). Este pulso se enfoca en la celda C2, que contiene el mismo colorante que se utilizó en los osciladores, con una lente esférica LE2 y una lente cilíndrica LC2 que producen una zona excitada a lo largo de la celda, de la misma forma que en el caso del oscilador.

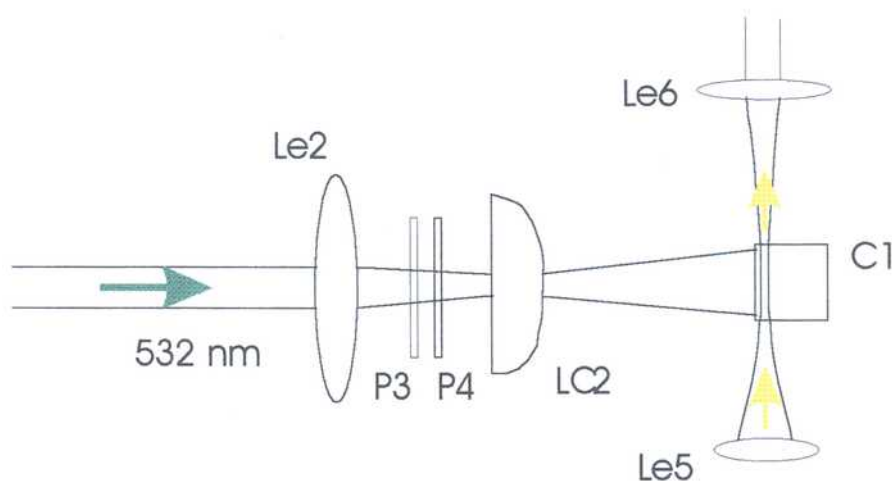


Figura 4.4: Esquema de amplificador del láser de colorantes

Por otro lado, se enfoca en la celda el pulso generado en el oscilador. Para ello se coloca la lente LE3 de 25cm de distancia focal a 50cm de la celda C1 para formar una imagen a 1m de la zona excitada en la celda (ver esquema en 4.2). Se colocan a continuación las lentes LE4 y LE5 que coliman y finalmente enfocan el pulso en la celda (C2). Para la amplificación se busca que incidan simultáneamente el pulso de bombeo con el del oscilador de forma que, el primero genere inversión de población y el pulso que se va a

La energía de bombeo se controla, igual que para el caso de los osciladores, con los polarizadores P3 y P4, como se muestra en la figura 4.4. La lente LE6 es utilizada para colimar el haz.

Con esta configuración se consiguieron factores de amplificación cercanos a mil, sin embargo si la energía de bombeo es muy grande, el ASE producido por el mismo amplificador se superpone con el pulso amplificado y lo distorsiona. En los casos donde se minimizó el ASE del amplificador y el ancho de pulso, el factor de amplificación fue cercano a cien.

### 4.3.2 Experimento

#### Muestra

Para elegir la muestra a ensayar, se tuvo en cuenta que el sistema soluto-solvente fuera una combinación que cumpliera con las siguientes características:

- 1- que la molécula fluorescente fuera aproximadamente esférica.
- 2- que los tiempos de difusión y fluorescencia fueran comparables y a la vez mayores al ancho temporal del pulso de excitación.

Se encontraron dos combinaciones atractivas para aplicar nuestra técnica de estudio. La primera fue utilizar rodamina 101 como colorante y etylen-glicol como solvente, la segunda fue utilizar el mismo colorante pero disuelto en glicerina [7]. Debido a que la glicerina presenta una dificultad adicional, por el hecho de ser higroscópica, se decidió finalmente utilizar la combinación rodamina 101-etylen glicol.

Para obtener una estimación del tiempo de difusión rotacional con mediciones estacionarias, se utilizó un fluorímetro con lámpara de xenón. Se realizaron mediciones de anisotropía de fluorescencia estacionaria, en función de la temperatura de la muestra, en un rango entre  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $50^{\circ}\text{C}$ .

Suponiendo un modelo simplificado de molécula esférica, la anisotropía de fluorescencia estacionaria es:

$$\langle r^2 \rangle = \frac{r_o^2}{3} \quad (4.1)$$



Asumiendo el modelo D-S-E ( $\phi \propto \frac{1}{T}$ ), y conociendo el tiempo de fluorescencia  $\tau$  determinamos el valor de  $\phi$  a partir de la curva  $\langle r \rangle$  en función de la temperatura.

Con estas mediciones se obtuvo un valor  $\phi = 3,5 \text{ ns}$  para el sistema rodamina 101 en etylen glicol.

### Esquema experimental

Una vez elegida la muestra, y con el sistema de láser de colorantes descrito en la sección anterior, se armó el esquema experimental que se muestra en la figura 4.5

En este sistema, el pulso de excitación es dividido en dos partes aproximadamente iguales. A continuación se introduce un retardo temporal entre ambos, utilizando un interferómetro de Michelson con dos retrorreflectores, uno de los cuales está montado sobre un riel (figura 4.5). Los dos pulsos resultantes se enfocan en la muestra luego de pasar por un polarizador que define el eje  $Z$  de excitación. En dirección ortogonal al haz, se colecta la fluorescencia y se la hace incidir en el sistema de detección. Simultáneamente, se toma una muestra de la energía del pulso incidente para poder normalizar la señal de fluorescencia.

En la detección, se utilizaron dos fotodiodos idénticos (Thorlab 434), uno para medir la fluorescencia total después de la doble excitación, y el otro para medir la energía de excitación (según se muestra en la figura 4.5). Las dos señales fueron luego amplificadas y almacenadas en un esquema "sample and hold", para luego adquirirlas con una tarjeta A/D siguiendo el esquema que se muestra en la figura 4.6

El amplificador y el sistema de adquisición fueron desarrollados en el laboratorio, y permiten medir energía de fluorescencia y energía de excitación pulso a pulso. Fue necesario implementar este sistema debido principalmente a las fluctuaciones del láser (5%), mucho mayores que las esperadas para la energía diferencial que, de acuerdo a la expresión 2.54 resultan del 1%. Este valor surge al suponer una energía de excitación de  $100 \text{ nJ}$ , una sección eficaz  $\sigma = 5 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$  y un área de excitación de  $10^{-4} \text{ cm}^2$ .

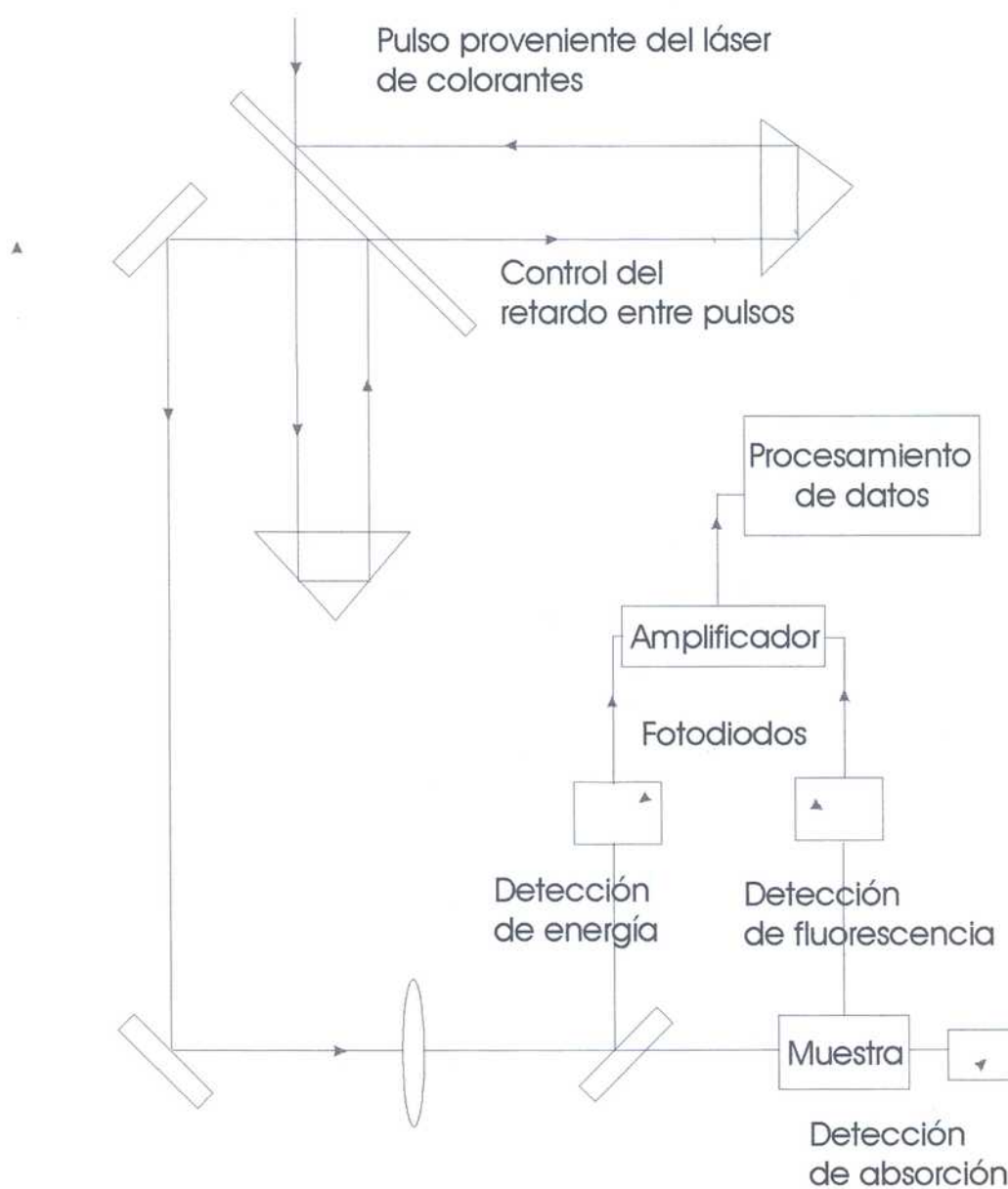


Figura 4.5: Esquema experimental utilizando el láser de colorantes

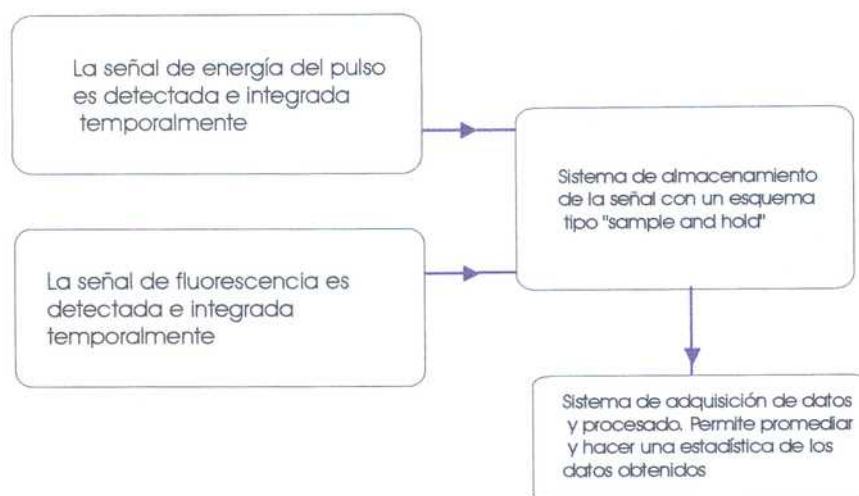


Figura 4.6: Esquema de amplificación y adquisición de datos

paralela y una tarjeta de adquisición con una resolución de 12bits, era almacenada.

De esta forma, la energía de fluorescencia y la energía del pulso incidente eran registradas en función del retardo entre pulsos.

Debido a las fluctuaciones en la energía del pulso de excitación, para cada retardo se tomó un promedio de 1000 pulsos.

### Resultados obtenidos

En esta sección se presentan los resultados obtenidos con el esquema descrito en la sección anterior. El objetivo de las mediciones fue obtener una curva de energía diferencial en función del retardo entre pulsos. A partir de esta curva y a través de un ajuste con las expresiones de energía diferencial obtenidas en 3.21 se determinaron los valores para los tiempo de difusión rotacional.

Para obtener la curva de energía diferencial se procedió de la siguiente manera: en primer lugar se midió la fluorescencia después de la doble excitación en función del retardo. Simultáneamente se midió la energía de excitación para tomarla como señal de normalización de acuerdo al esquema mostrado en la figura 4.6. Junto con estos valores, se midió la fluorescencia obtenida con un solo pulso, proveniente de la rama móvil. Esto se hizo

normalizó con la energía de excitación. El objetivo de esta medición fue determinar las modificaciones en la señal de fluorescencia al aumentar el retardo entre pulsos, debido a cambios en las características del haz incidente. El rango de valores de la línea de retardo, para la medición de energía diferencial en este sistema, es entre 0 y 6 nanosegundos.

En la figura 4.7 se muestra una medición típica para obtener un punto en la curva de energía diferencial en función del retardo. Las curvas en la figura representan: la energía de fluorescencia, la energía de excitación y la energía de fluorescencia normalizada que resulta del cociente entre las dos anteriores. Todos estos valores son tomados para un mismo retardo. Cada punto en estas curvas corresponde al valor obtenido con un pulso de excitación.

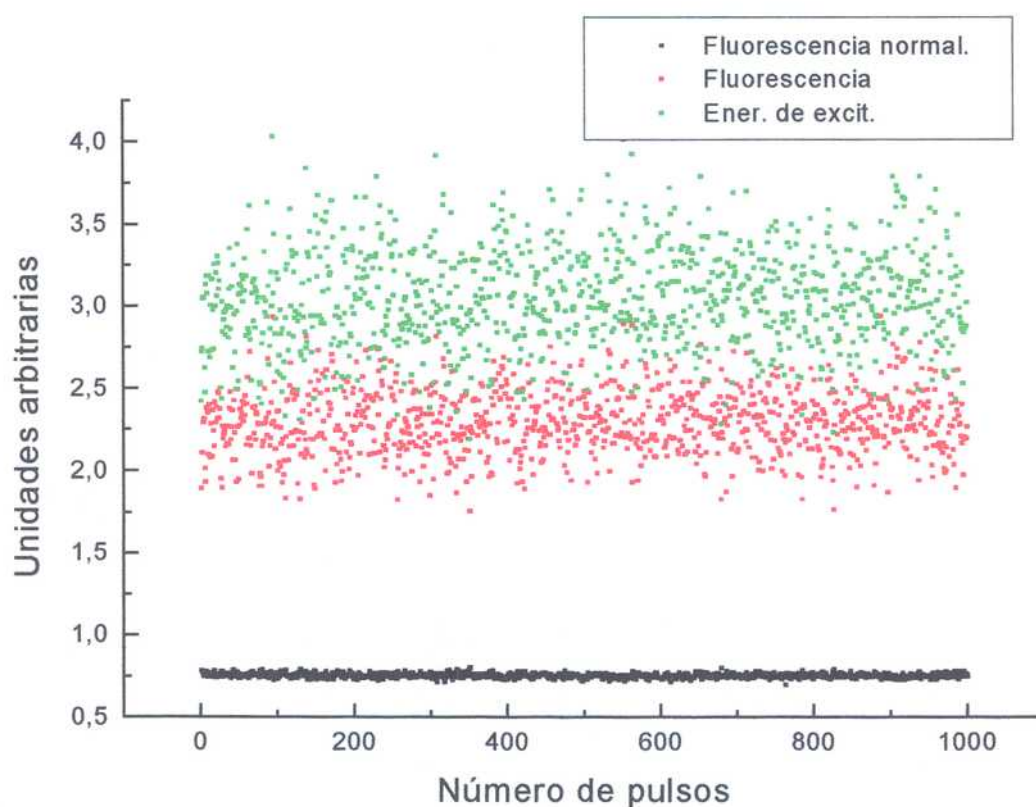


Figura 4.7: Valores de energía de fluorescencia, energía de excitación y energía de fluo-



En este caso la señal que se muestra fue amplificada y procesada de acuerdo a 4.6. Las curvas corresponden a una muestra de 1000 pulsos. El promedio de la energía normalizada de estos 1000 pulsos se utiliza para obtener un valor de energía diferencial.

Como puede observarse, a partir de este gráfico la señal normalizada presenta una fluctuación mucho menor comparada con la señal sin normalizar.

Si llamamos  $\Delta flu$ ,  $\Delta ene$ ,  $\Delta flunor$  a la dispersión de la señal de fluorescencia, la energía de excitación y la fluorescencia normalizada respectivamente, los valores para las fluctuaciones en este caso, son :

$$\frac{\Delta flu}{flu} = 1.6\% \quad \frac{\Delta ene}{ene} = 2.9\% \quad \frac{\Delta flunor}{flunor} = 0.02\%$$

### Energía diferencial

Las curvas de energía de fluorescencia normalizada, obtenidas de acuerdo a la descripción dada en la sección anterior se muestran en el gráfico 4.8. Las dos curvas corresponden a la señal obtenida cuando se excita con dos pulsos y la obtenida cuando se excita sólo con la rama móvil.

Con estos valores para la energía de fluorescencia, obtenemos la energía diferencial de acuerdo a la siguiente relación :

$$Edn_p = - \left( \frac{E_{2p}(t_o)}{E_p(t_o)} - \frac{E_{2p}(t_o = \infty)}{E_p(t_o = \infty)} \right) \quad (4.2)$$

donde  $E_{2p}(t_o)$  representa la energía obtenida con doble excitación y a retardo  $t_o$ .

$E_p(t_o)$  es la energía de fluorescencia obtenida con un solo pulso, el correspondiente a al rama móvil, y con el mismo retardo.

La expresión 4.2, utilizada con los datos experimentales, es equivalente a la expresión 2.54 obtenida a partir del modelo teórico.

Una medición típica se muestra en la figura 4.9. Cada punto en en la curva se obtiene de acuerdo a 4.2, utilizando la normalización de la energía de fluorescencia descripta



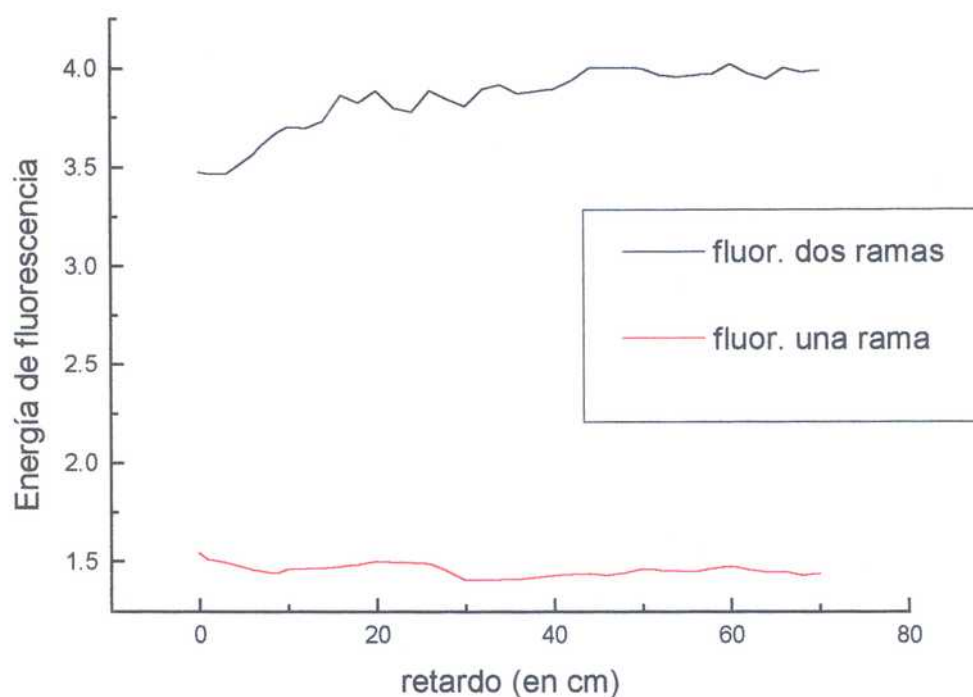


Figura 4.8: Energía de fluorescencia obtenida excitando con dos ramas (doble excitación) y con una sola rama (excitación simple)

El ajuste fue realizado con una curva del tipo:

$$Edn_p = K(A + B \exp(-\frac{t_o}{\phi})) \quad (4.3)$$

Esta expresión se corresponde con la obtenida para  $Edn_p$  en 2.54 en el caso de una molécula esférica con detección de la fluorescencia en dirección paralela a la polarización de la excitación. Los valores de  $A$  y  $B$  se dejaron libres en el ajuste.

Los valores de  $\phi$  obtenidos con este sistema y de acuerdo a la técnica descrita presentan una gran dispersión que va desde  $\phi = 2ns$  hasta un valor de  $\phi = 4ns$ .

Esto se debe principalmente, a los errores introducidos por dos razones:

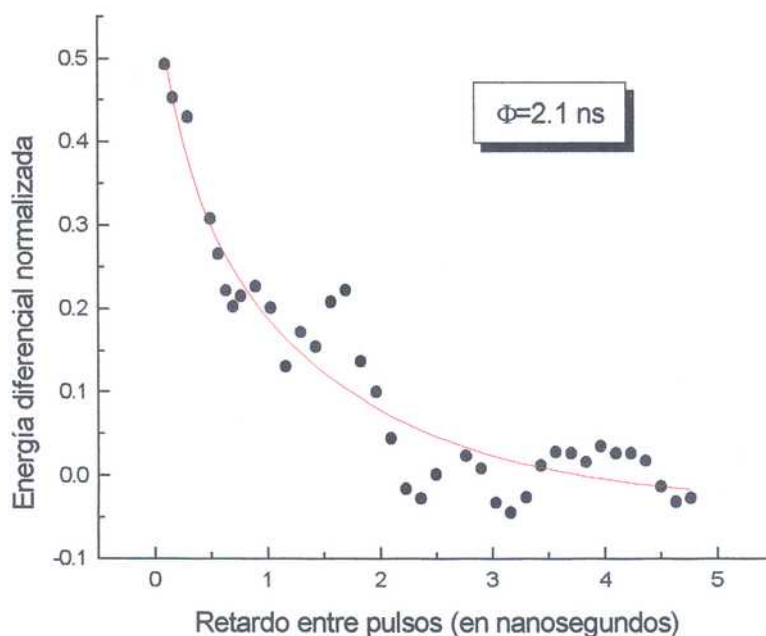


Figura 4.9: Una medición típica de energía diferencial en función del retardo entre pulsos

2- debido al ancho de pulso de excitación ( $\leq 800 \text{ ps.}$ ), fue necesario utilizar muestras con tiempos de fluorescencia y rotación largos ( $> 3 \text{ ns.}$ ). Esto requiere la implementación de líneas de retardo del orden de 1 m, lo que introduce una fuente de error, al aumentar el retardo, producido por variaciones en las características del haz sobre la muestra (aumento de la divergencia, desplazamiento lateral, etc). Estas variaciones pueden producir fluctuaciones, en la señal de energía de fluorescencia, mayores a las esperadas por el movimiento de rotación del fluoróforo, por esa razón son analizadas en detalle, más adelante en este capítulo.

Para mejorar este esquema de medición, se decidió realizar el experimento reemplazando

## 4.4 2 Sistema de pulsos ultracortos.

### 4.4.1 Láser de Nd- YAG

En esta etapa se decidió reemplazar la fuente de excitación, en un intento de mejorar el sistema descrito en la sección anterior. En un primer arreglo experimental se reemplazó el láser de colorantes por un láser de Nd-YAG , que emite pulsos de  $10ps$ . de ancho temporal, centrados en una longitud de onda de  $532nm$ , con una repetición de  $100MHz$  y una potencia media de  $10\mu W$ .

Este sistema presenta ventajas con respecto al láser de colorantes: alta repetición, ancho de pulso 100 veces menor y la posibilidad de utilizar técnicas de lockin en la detección.

El esquema general armado se muestra en la figura 4.10. La modificación sustancial, con respecto al sistema anterior, es en el sistema de detección

Cada una de las ramas de excitación es modulada a distinta frecuencia y la señal es detectada a la frecuencia suma. Este esquema es mejorado y explicado con más detalle en la siguiente sección. La señal de fluorescencia es normalizada con una reflexión del haz de excitación después de ser amplificada. La normalización es hecha por el mismo lockin.

Una medición típica a retardo fijo se muestra en la figura 4.11

Con este sistema no se obtuvieron resultados satisfactorios en las curvas de energía diferencial debido a que la relación señal/ruido fue muy baja. Esto se debió a que, con la energía de excitación disponible  $0.1pJ$  (potencia media  $10\mu W$ ) el factor  $K = 10^{-5}$ .

De acuerdo a lo discutido en 2.14 esto indica que la energía diferencial será un factor  $10^{-5}$  de la energía de fluorescencia ( $10 mV$ ), es decir en el orden de los  $100 nV$ , muy cerca del límite de sensibilidad del lockin utilizado para la detección.

A pesar de no haber obtenido mediciones de tiempos de difusión, se pudo mejorar el sistema de detección, y al tener alta repetición se pudo analizar cuán crítico resultó ser, en la señal de fluorescencia, la colimación del haz antes de la línea de retardo.

En lo que sigue se presenta un análisis detallado discutiendo este punto, en particular

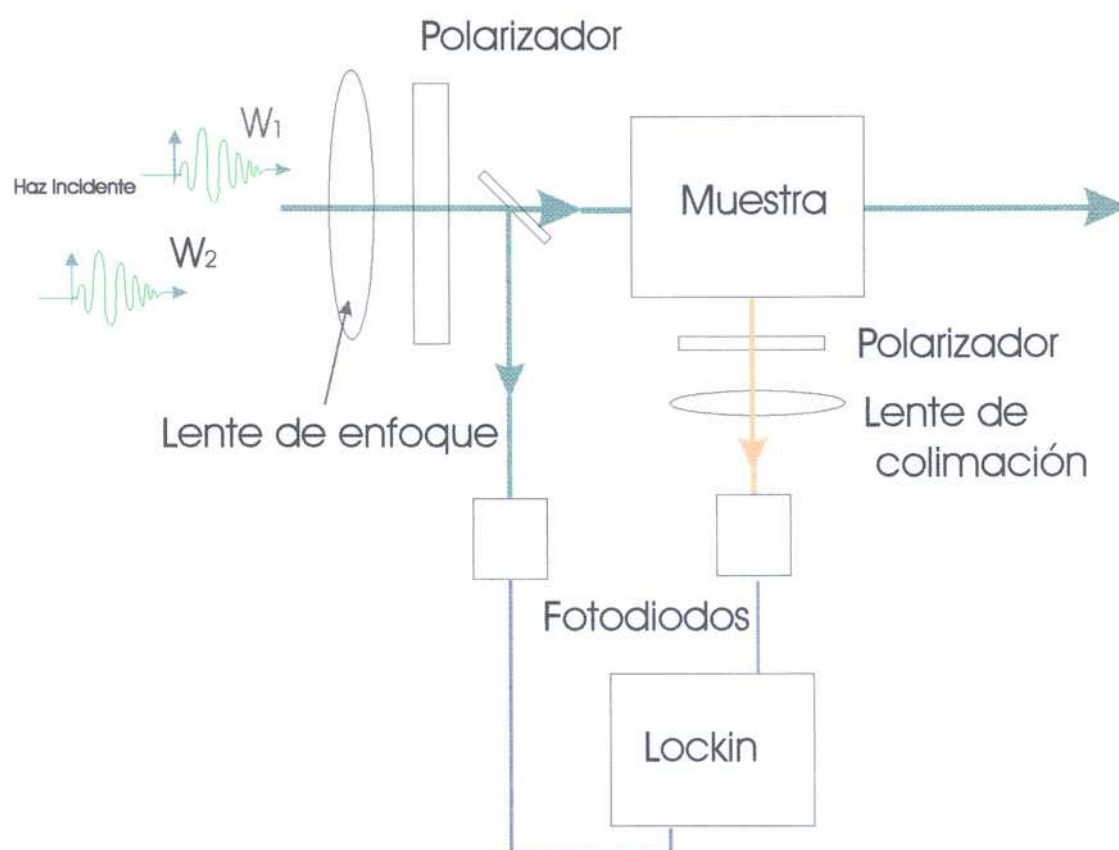


Figura 4.10: Sistema de detección de fluorescencia con el lock-in. Una de las ramas está modulada a  $W_1$  y la otra a  $W_2$ .

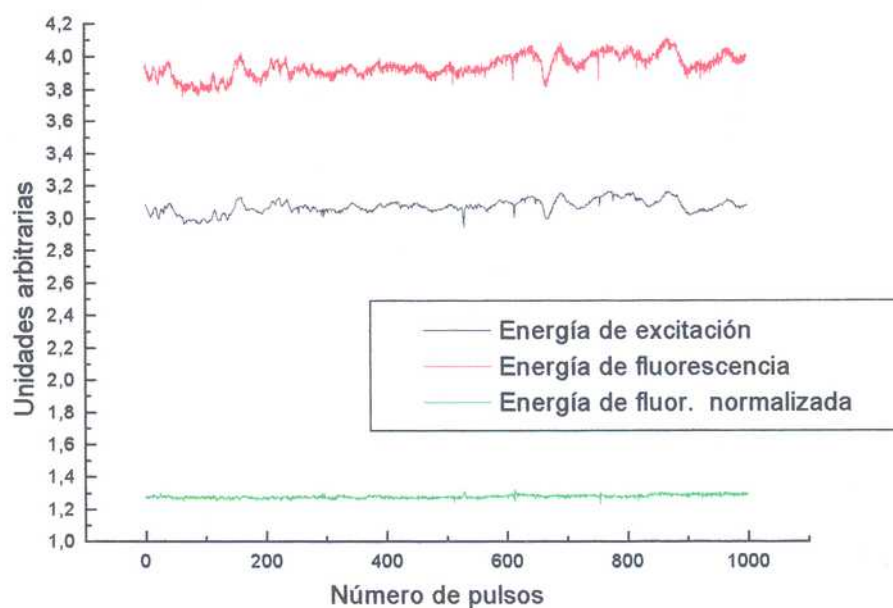


Figura 4.11:

haz de excitación (colimación, posición del foco, paralelismo, etc. ) al variar el retardo entre pulsos.

#### 4.4.2 Láser de Ti-zafiro

##### Descripción del esquema experimental

En este caso es utilizado como fuente excitación un láser comercial de titanio-zafiro (Mira 900-Coherent ) de 1W. de potencia media centrado en 800 nm con un ancho de pulso de 200 fs y una separación entre pulsos de 13 nanoseg. El equipo utiliza como sistema de bombeo un láser de argón (8 W. ).

Las ventajas de este sistema sobre los descritos anteriormente son varias. El tamaño del ancho de pulso permite estudiar sistemas con tiempos de difusión dos órdenes de magnitud menores que el caso anterior. Con ésto se logra, en primer lugar, retardos menores con la enorme simplificación que ésto representa en la línea de retardo, y en



menores a los de fluorescencia. Con estas condiciones podemos medir en la región donde la energía diferencial depende casi exclusivamente de los tiempos de difusión y no se ve prácticamente afectada por el decaimiento por fluorescencia según lo discutido en el párrafo 2-5-3.

Este sistema tiene también alta repetición ( 76 Mhz ), lo que permite la detección con técnicas de lockin, igual que en el caso anterior.

El esquema utilizado es el que se muestra en la figura 4.12. El haz de entrada proveniente del láser de Ti-za pasa por el generador de segunda armónica, luego es dirigido hacia el divisor de haz y la línea de retardo. Aquí se introduce una modulación con el chopper (una frecuencia distinta para cada haz ) y los dos pulsos son enfocados sobre la muestra. La fluorescencia es colectada con un sistema de lentes y por medio de una fibra se la hace incidir en el sistema de detección.

#### **Sistema doblador de frecuencia**

El equipo comercial disponible cuenta también con un sistema doblador de frecuencia (Inrad 980) que permite obtener una potencia media de hasta 350 mW, con pulsos de 200 fs. centrados en 400 nm.

Con este sistema doblador no se pudo conseguir un haz bien colimado, ya que, debido al esquema de enfoque y colimación en el cristal utilizado en este equipo el haz resultó ser astigmático. Esto dificultó el control de la colimación lo que produjo una variación del tamaño de la cintura en el punto de enfoque sobre la muestra, generando una fuente de error ya que se modificaron las características del haz. De esta forma se producen variaciones en la señal de energía de fluorescencia que se superponen a las producidas por el fenómeno de difusión, que son las que interesan medir. O sea que la señal detectada tendrá variaciones con el retardo que serán suma de la producida por anisotropía más la contribución, no deseada, generada por los cambios en las características del haz incidente. Por esta razón fue necesario armar un sistema doblador que permitiera corregir el astig-

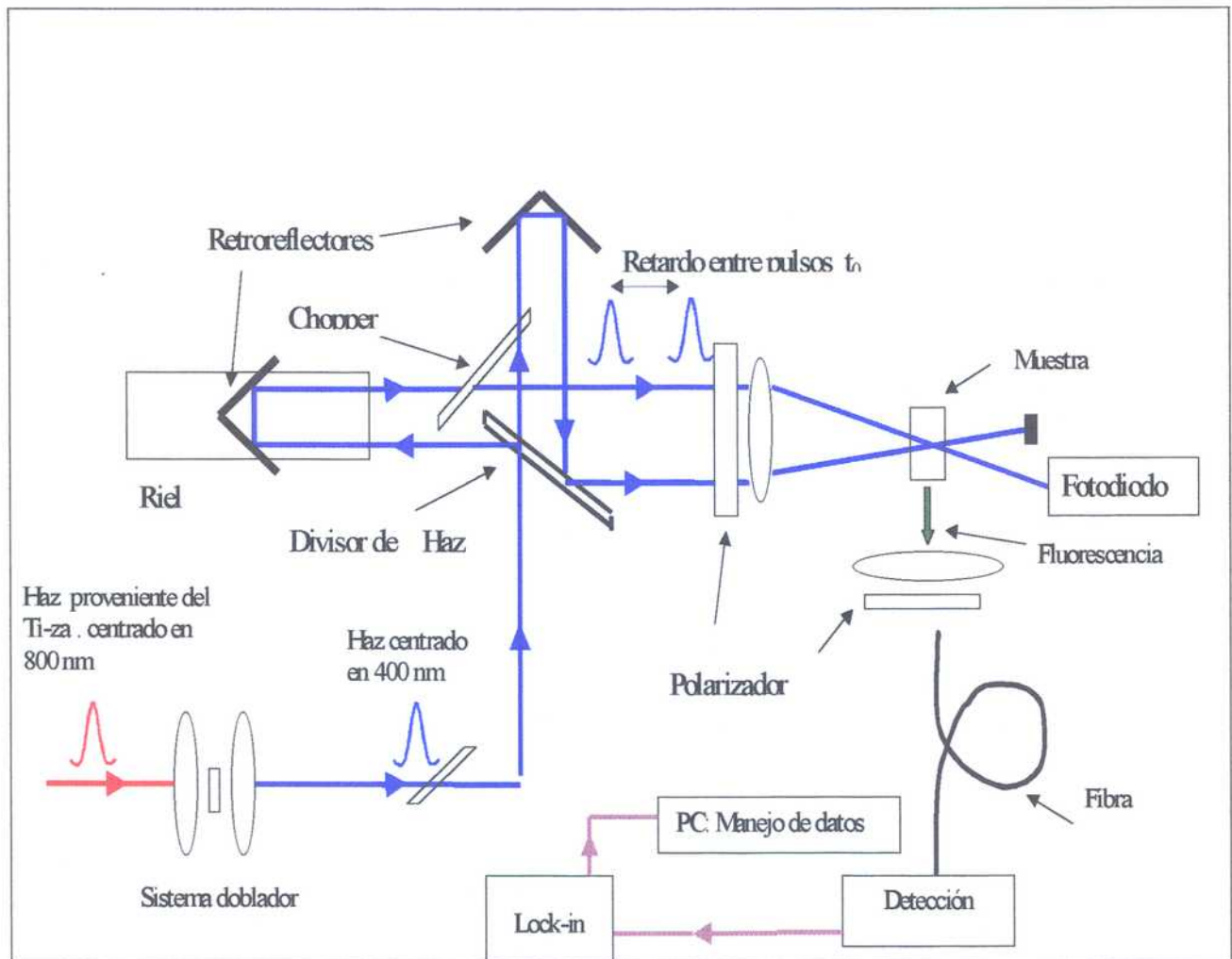


Figura 4.12: Esquema experimental

El sistema doblador armado consistió en un telescopio con dos lentes plano-convexa (Newport SPX) de 5 cm de distancia focal. En el centro se colocó un cristal generador de segunda armónica LBO de 1.5 mm de espesor. Las segunda lente y el cristal se montaron sobre sistemas de translación para poder ajustar el enfoque sobre el cristal y controlar la divergencia del haz de salida. Se utilizó un posicionador angular para controlar el ángulo del cristal doblador y maximizar la conversión. Este esquema nos permitió obtener hasta 300 mW a la longitud de onda de 400 nm a partir de 1,10 W en 800 nm.

Si bien con este sistema se puede tener un control más fino sobre la colimación del haz emergente tiene la desventaja de ser muy sensible a la alineación del haz de entrada. Para lograr una potencia de salida de mas de 200 mW era necesario hacer un ajuste diario, en la alineación de las lentes del doblador, esto se debe a que para mantener los pulsos ultracortos el láser de titanio-zafiro requiere una alineación permanente, que va modificando la dirección del haz de salida.

Para separar la segunda armónica del fundamental se utilizó un divisor de haz dielectrico y múltiples reflexiones en espejos dieléctricos para 400 nm ( New Focus 510).

### **Línea de Retardo.**

La línea de retardo se armó con un esquema similar al de un interferómetro Michelson, con retrorreflectores en los extremos de cada rama ( ver figura 4.12). Uno de los retrorreflectores estaba montado sobre un riel de translación que permitió variar la longitud de esa rama hasta en 1 m, permitiendo introducir un retardo entre pulsos de hasta 6 ns. De esta forma a la salida de la línea de retardo se tenían dos pulsos de aproximadamente igual intensidad y con un retardo variable controlado por la diferencia de longitud entre las ramas.

El divisor de haz utilizado fue de 5 mm de espesor. Encontramos que divisores más delgados hacen perder el paralelismo entre los haces. Esto es debido a la deformación producida al montar el divisor en el posicionador. Este efecto introduce en el paralelismo entre los haces de salida un error mucho mayor al introducido por los retrorreflectores.

riel tiene una precisión que asegura un corrimiento lateral máximo de  $100\ \mu m$  en  $1\ m$  de desplazamiento, mientras que el otro retrorreflector, que se mantuvo fijo, estaba montado sobre un sistema XY que permitía mover la posición entre los dos haces al incidir sobre la lente de enfoque.

Con este sistema de posicionador fue posible pasar desde un esquema donde los dos haces a la salida se superponen, o sea un esquema colineal en donde los haces inciden en el centro del retrorreflector, hasta separarlos una distancia de aproximadamente  $1\ cm$ . En este último caso se utilizó un esquema no colineal, en donde los haces incidían en ángulo. Esta disposición se utilizó para evitar una reflexión en el divisor del haz proveniente de la rama móvil ( ver figura 4.12). En los casos ensayados el ángulo entre los haces era cerca de  $5^\circ$ .

El primer esquema de haces colineales, tiene la ventaja de que la zona de superposición es mayor, lo que aumenta el valor de energía diferencial ( ver 3.21) y hace más sencilla la colimación de la fluorescencia. Sin embargo esto implica tener que usar los retrorreflectores con el haz incidiendo en el centro del triedro, lo que deforma el modo del haz de salida y baja la reflectividad en un 30%. Otros esquemas colineales no eran posibles, debido a que, para la detección de la fluorescencia se debía modular cada haz a distinta frecuencia. En el esquema de haces separados este problema no existe pero es más crítica la determinación de la zona de excitación.

Los retrorreflectores utilizados tienen una precisión de  $1\ arcseg$ , para el caso de R1 (rama móvil) , y  $5\ arcseg$  para R2 ( rama fija).

### **Sistema de enfoque**

A la salida de la línea de retardo se colocaba un polarizador en la dirección  $Z$  según la convención dada en el capítulo anterior que define el eje de polarización de la excitación. El coeficiente de extinción del polarizador era de  $10^{-5}$ .

Los haces pasaban luego por una lente que los enfocaba sobre la muestra.

Se ensayaron distintos valores para la distancia focal, por un lado distancias focales cortas

de moléculas excitadas elevando el valor de energía diferencial. Sin embargo el parámetro confocal disminuye haciendo más pequeña la zona de superposición de los dos haces, lo que dificulta la detección al hacer más crítica la alineación. Por otro lado lentes de distancia focal larga no tienen este inconveniente pero bajan críticamente la densidad de energía en el volumen excitado, disminuyendo la señal de fluorescencia.

Los valores ensayados fueron desde  $f = 10 \text{ cm}$  hasta  $f = 0.5 \text{ cm}$ , este último obtenido con un objetivo de microscopio. Los mejores resultados se obtuvieron con lentes de  $7.5 \text{ cm}$ . En nuestro esquema con distancias menores a esta última fue difícil controlar la superposición entre los haces.

#### 4.4.3 Análisis de las características de los dos haces en la zona de superposición.

Un punto clave en toda la técnica es la necesidad de montar un esquema que permita introducir el retardo deseado manteniendo el sistema alineado y minimizando las variaciones en las características de los dos haces de excitación en la zona donde se ubica la muestra. El experimento requiere que la zona de superposición de los dos haces se mantenga constante al ir variando el retardo, de lo contrario las variaciones en la fluorescencia producidas por la difusión rotacional de la molécula, que es lo que se intenta medir, se superpondrían con las variaciones producidas por cambios no deseados en las características del haz de la rama móvil ( aumento de la divergencia del haz, corrimiento lateral, etc ). Lo que buscamos entonces es poder minimizar las variaciones en la fluorescencia producidas por estos cambios en el punto de enfoque de la muestra. Estas variaciones son producidas al desplazar una de las ramas del sistema para introducir el retardo.

A continuación se presenta un análisis de las influencias de estas variaciones en la señal de fluorescencia.

Para los cálculos consideramos valores tomados del experimento, en este caso tomamos:  $f = 7.5 \text{ cm}$  para la lente de enfoque,  $\lambda = 400 \text{ nm}$  para la longitud de onda del láser,  $w_0 = 1.0 \text{ mm}$  para el radio en la cintura del haz a la salida del sistema doblador. Con



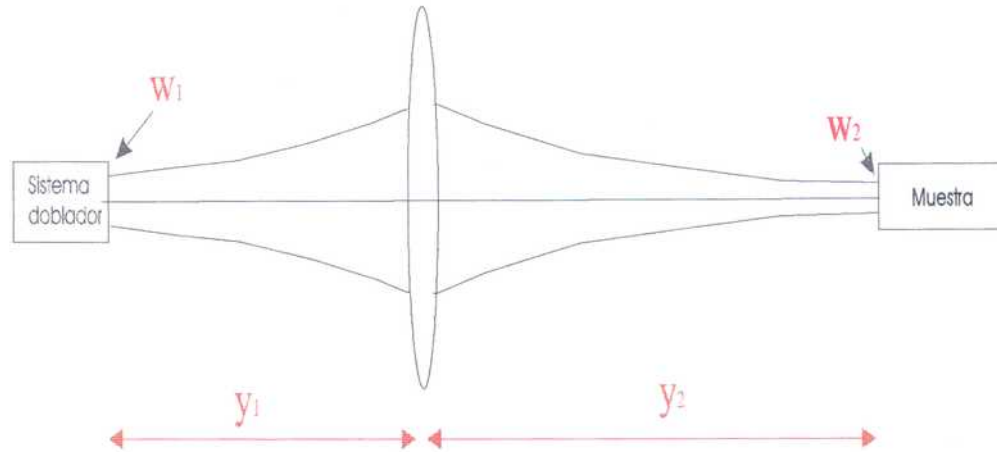


Figura 4.13:

línea de retardo.

Esta distancia varía entre  $y_1 = 215 \text{ cm}$  que corresponde al retardo  $t_o = 0$  y  $y_1 = 245 \text{ cm}$  que corresponde a  $t_o = 1 \text{ ns}$ , luego el haz pasa por la lente y después de otra translación ( $y_2$ ) se enfoca en la celda .

#### Posición y diámetro de la cintura en el foco en función del retardo

La posición de la cintura con este esquema es:

$$y_2 = \frac{-y_1^2 f + y_1 f^2 - y_0 f}{y_1^2 - 2 y_1 f + f^2 + y_0^2} \quad (4.4)$$

En el gráfico de la figura 4.14 se ve la variación de la posición de la cintura ( $y_2$ ) cuando se aumenta el valor de  $y_1$  al variar la rama móvil.

A partir de este gráfico se observa que la variación calculada en la posición del punto focal es un factor  $10^{-5}$  de la distancia focal  $f$ , cuando el retardo varia en el orden de 1 nanosegundo.

Experimentalmente se verificó que no hubiera variaciones en la posición de la cintura al mover el riel de retardo, para ésto se determinó la posición del foco para retardo cero y luego se verificó que esta posición no cambiara al ir aumentando el retardo.

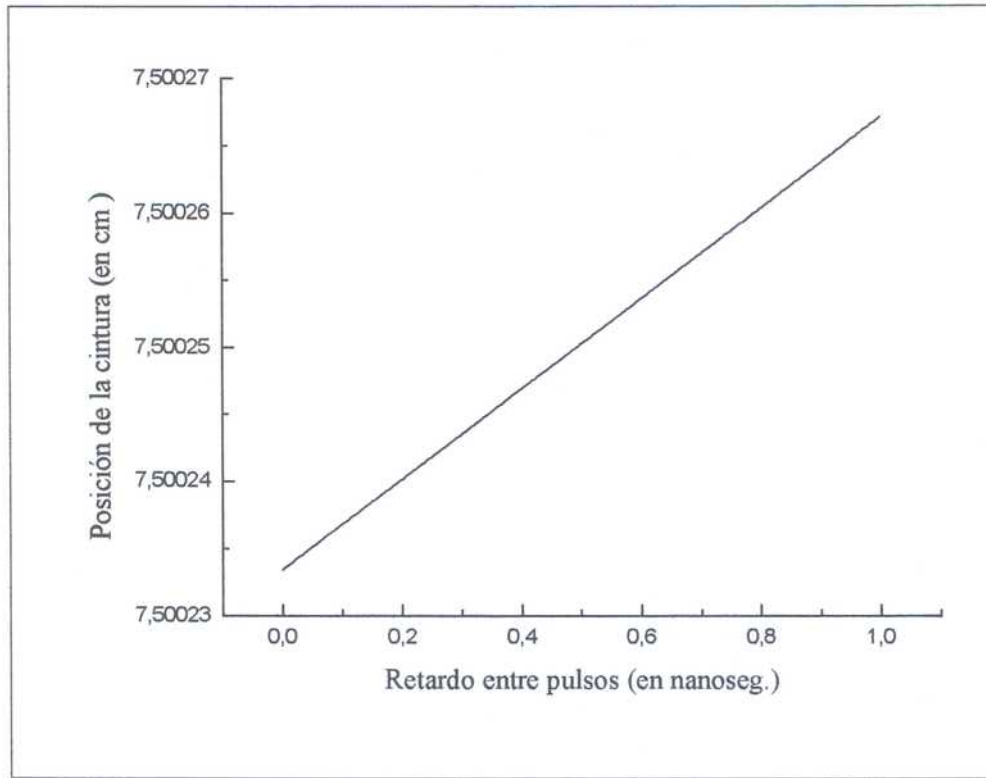


Figura 4.14: Figura 3-4: Posición del punto de enfoque en función del desplazamiento de la rama móvil en el sistema de retardo.

objeto uno de los haces y ver como cambia la imagen antes y después del foco. Se tomó como posición de la cintura el momento en que deja de verse la imagen de un haz y pasa a verse la imagen del otro. De esta forma, la posición de la cintura se midió para el caso en que  $f = 7.5 \text{ cm.}$  y  $\Delta y_1 = 30 \text{ cm}$  con una precisión de  $10 \mu\text{m.}$

Para analizar las variaciones esperadas en el radio de la cintura del haz en función de la distancia focal y la distancia  $y_1$  utilizamos la siguiente expresión que surge de los cálculos realizados con el esquema 4.13:

$$w_2 = \frac{\lambda f}{\pi w_0} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{y_1 - f}{y_0}\right)^2}} \quad (4.5)$$

Donde  $w_2$  representa el radio de la cintura en la zona de excitación de la muestra ( ver figura 4.13).

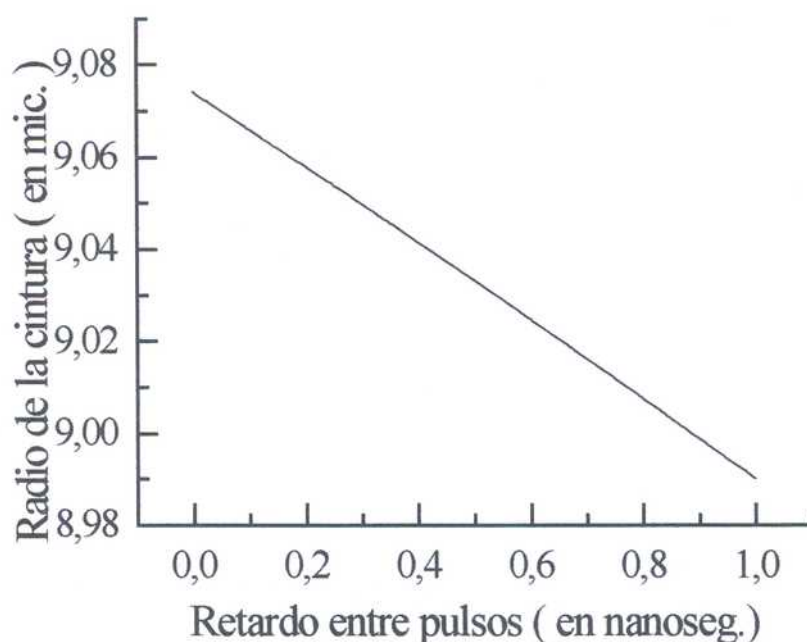


Figura 4.15: Variación de la cintura en el punto de enfoque con el retardo entre pulsos

Nuevamente se tomaron valores de  $y_1$  correspondientes a un retardo de 1 ns.

Experimentalmente no fué posible, con el instrumental disponible, medir el tamaño de la cintura en el punto de enfoque sobre la muestra pero sí se midió la cintura del haz antes de la lente de enfoque.

Las mediciones se realizaron con una cámara CCD (Coherent-Cohu 48) según el esquema que se indica en la figura 4.16.

Para cada punto se hizo una estadística de entre 50 y 100 muestras y de este promedio se obtuvo un valor del tamaño del spot. Este tamaño resulta de obtener el área de todos los pixel en la imagen del spot con energías hasta un 25% de la energía máxima. Haciendo la suposición de que es circular se despeja el radio del spot. Variando la posición del retrorreflector ( $Y_1$  en la figura 4.16) obtenemos los valores de la cintura en función del retardo.

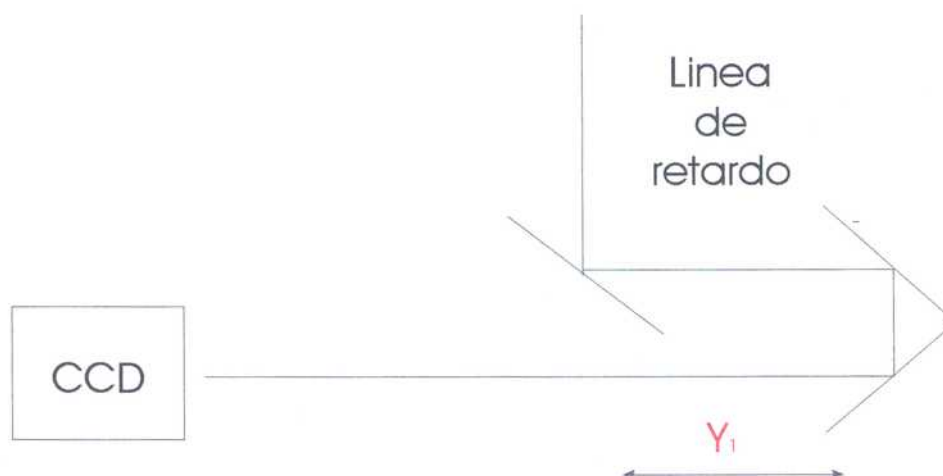


Figura 4.16: Esquema para la medición del ancho de la cintura en función del retardo

pulsos se muestra en el gráfico 4.17.

### Paralelismo y alineación de los haces

Además de los cambios en los parámetros del haz en el punto focal por efectos de la difracción debemos considerar las modificaciones introducidas por las imperfecciones en los elementos utilizados. Estimamos que la más importante es debido a la separación entre los haces en el punto focal (ver figura 4.18 ) ya que esta separación modifica la superposición entre los dos volúmenes excitados. Estas variaciones son producidas por la pérdida del paralelismo debido a imperfecciones en el retrorreflector y el corrimiento lateral introducido por el riel al producirse el desplazamiento necesario para el retardo. En el primer caso el efecto producido es una separación entre los haces en el punto focal debido a que el haz proveniente de la rama móvil incide en la muestra con un ángulo  $\alpha$  (medido con respecto al eje del haz proveniente de la rama fija). En el segundo caso el desplazamiento lateral produce un aumento adicional en  $\Delta x$  (desplazamiento entre los dos haces). En la zona excitada tenemos una situación como se indica en la figura 4.18. El corrimiento en el punto focal ( $\Delta x$ ) debido al efecto de la falta de paralelismo relativo



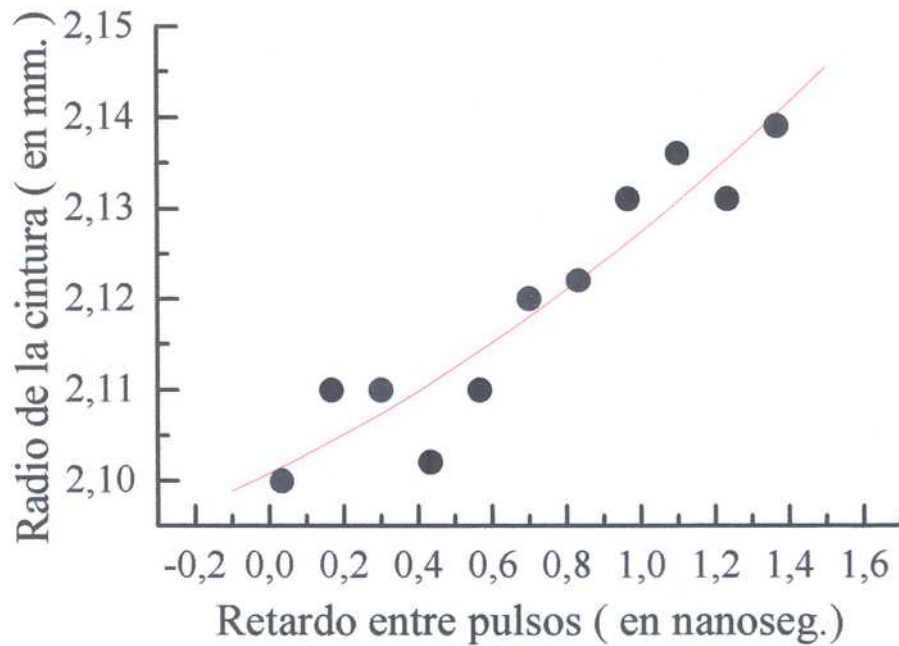


Figura 4.17: Diámetro del haz en función del retardo entre pulsos medido antes de la lente de enfoque.

$$\frac{\Delta x}{w_2} = \frac{\pi w_0 t g(\alpha)}{\lambda \sqrt{1 + \left(\frac{y_1 - f}{y_0}\right)^2}} = 4 \cdot 10^{-2} \quad (4.6)$$

La estimación resulta de suponer las características del haz dadas anteriormente y las especificaciones del retrorreflector ( $1''$ ) y de la alineación del riel (máximo desplazamiento lateral  $10 \mu m$  en  $1 m$ ), que fueron utilizados en el experimento.

#### Optimización de la alineación, divergencia y paralelismo

La cámara y el esquema descrito en la figura 4.16 fueron utilizados para controlar el desplazamiento lateral que se produce cuando el haz de la rama móvil no incide paralelo al riel. Esto requiere una cuidadosa alineación de este haz, para optimizar la alineación se procedió de la siguiente forma:



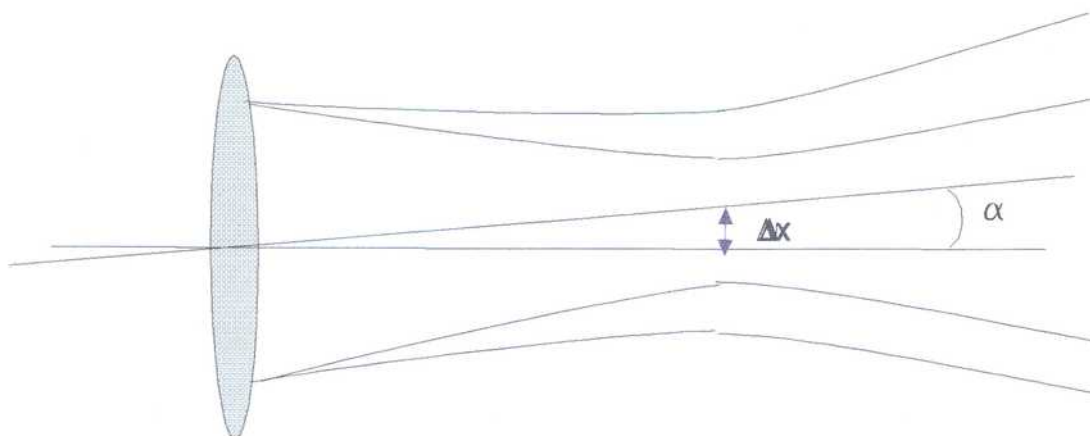


Figura 4.18: Desviación en la superposición de los dos haces

se obtiene un perfil de intensidades en dos ejes (tomando un sistema de ejes imaginario  $XY$  en el centroide del spot), se aumenta el retardo, y se vuelve a medir el perfil. Se corrige la alineación hasta que coincide el perfil obtenido a retardo  $t_0$  con el obtenido a retardo cero que se toma como patrón. Esto se hace modificando la alineación a la entrada del riel con la posición del divisor de haz y uno de los espejos de salida del láser. El procedimiento se repetía hasta optimizar la alineación.

Este método se utilizó también para optimizar la posición de las lentes del sistema doblador en el ajuste de la colimación del haz discutido anteriormente.

Haciendo desplazamientos de mas de  $15\text{ m}$  y midiendo la separación entre los centroides se controló el paralelismo, aunque este método no nos permitió alcanzar la precisión necesaria para garantizar la especificación en el paralelismo dada por el fabricante.

Podemos entonces asegurar que con los valores dados anteriormente se cumple:  $\alpha \leq 10^{-4}$ .

De acuerdo a las consideraciones anteriores se puede estimar la variación en la superposición de los volúmenes excitados por cada uno de los pulsos incidentes cuando se introduce un retardo de  $1\text{ ns}$  entre pulsos. Si suponemos que antes de iniciar el retardo la superposición es del 100% y que el volumen excitado por el primer pulso es  $V$  entonces:

$$\Delta V \sim 10^{-5} \quad (4.7)$$

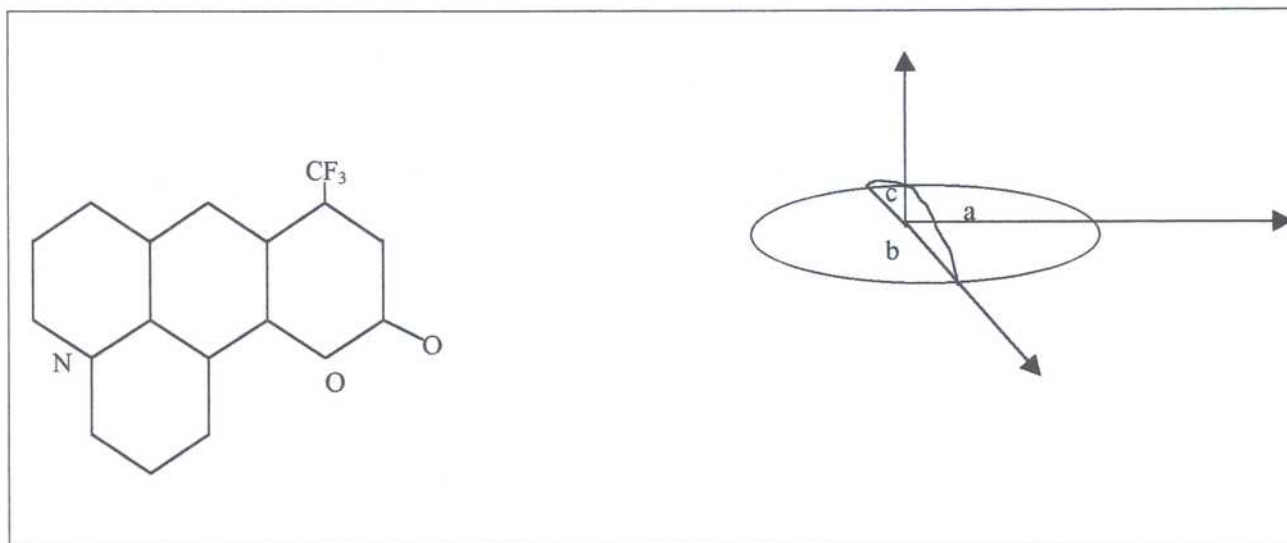


Figura 4.19: Coumarina 153 , se muestra en 2) la forma elipsoidal que se supone en los cálculos teóricos

#### 4.4.4 Muestra

Para la elección de la muestra utilizada en los primeros ensayos se tuvieron en cuenta los siguientes factores:

- 1-La longitud de onda de la excitación, de manera que estuviera cerca al pico de absorción.
- 2-La forma de la molécula de manera de poder reproducir las curvas obtenidas con nuestro modelo teórico de molécula elipsoidal o esférica.
- 3- Que se encuentren en la literatura mediciones similares que permitan poder hacer una comparación con los resultados obtenidos.

Se decidió utilizar dos colorantes de la familia de las coumarinas, la coumarina 153 y la coumarina 102.

Las características de tamaño, forma, espectros de absorción y fluorescencia para ambas moléculas son muy similares.

Las mediciones presentadas en este trabajo corresponden a muestras con coumarina 153

La estructura molecular y forma espacial que suponemos para la molécula se muestra en la figura 4.19.

es la de un elipsoide oblado. Los valores estimados en este trabajo para las longitudes de los semiejes del elipsoide son  $c = 2$ ,  $b = 4.8$ , y  $a = 6.1$ . ( ver figura 4.19).

Las curvas de absorción y fluorescencia con la coumarina 153 en etylenglicol utilizada en nuestro experimento se muestran en las figuras 4.20 y 4.21.

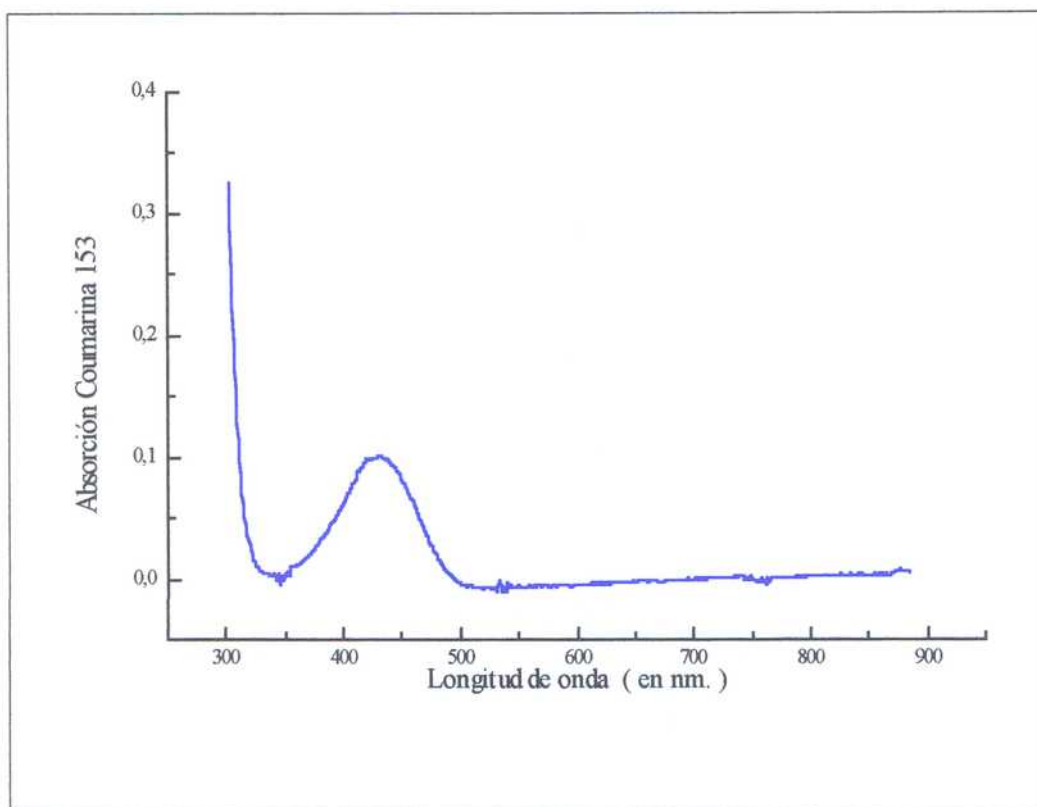


Figura 4.20: Absorción de coumarina 153 en etylen glicol.

Se observó que para potencias superiores al  $mW$  la señal de fluorescencia muestra un decaimiento lento (en el orden de los segundos) al usar celdas sin circulación. Este efecto es mucho más notorio en la coumarina 102 .

En el gráfico 4.22 se muestra la caída en la señal de fluorescencia en función del tiempo de excitación de la muestra. El primer decaimiento corresponde a un tiempo de 20 segundos con una potencia media de  $10mw$ . La caída en la señal de fluorescencia es de 1.3%, se deja de excitar un intervalo de 20 segundos y luego comienza la excitación nuevamente, se puede ver la recuperación en la intensidad de fluorescencia en este tiempo.

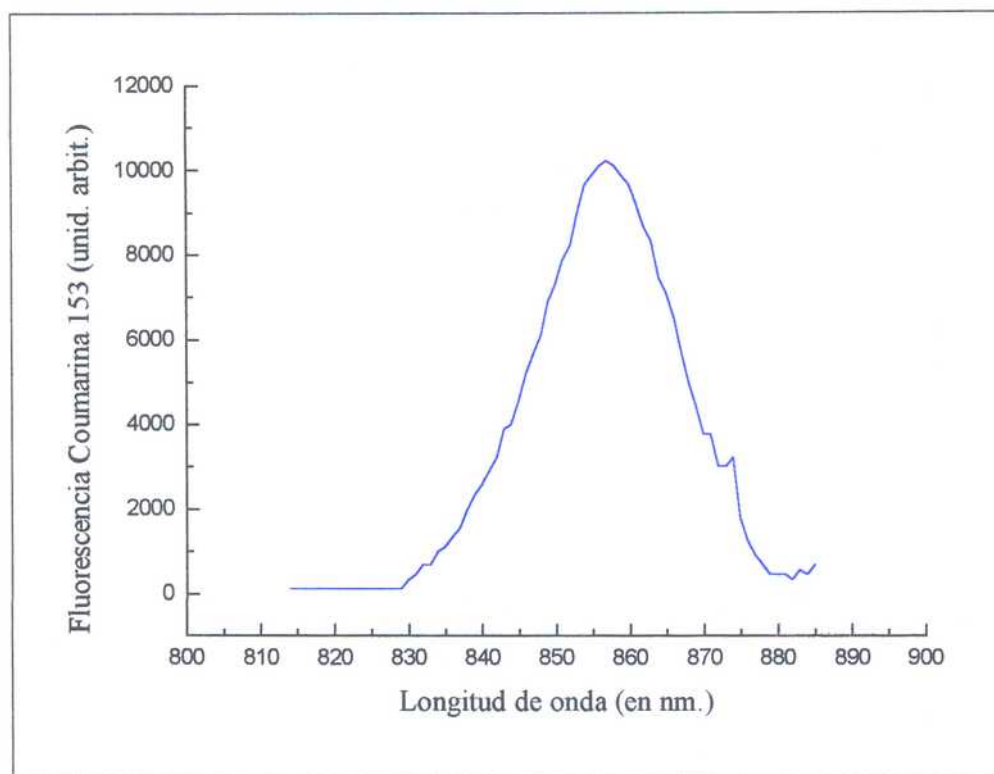


Figura 4.21: Espectro de fluorescencia de coumarina 153 en etylen glicol.

Este problema, debido a la degradación del fluoróforo, se corrigió con un sistema de circulación de la solución a excitar. En este esquema se utilizó, una bomba con velocidad de flujo controlable y un reservorio para minizar las fluctuaciones en la señal de fluorescencia producidas por vibraciones y turbulencias en el fluido.

La fluorescencia es colectada en dirección ortogonal a la de excitación según se muestra en la figura 4.12, con un sistema de dos lentes de distancia focal  $f = 3 \text{ cm}$ , de forma que la luz es colimada y enfocada sobre el sistema de detección. Se obtiene de esta forma una imagen de la zona excitada donde se colocan los filtros y los detectores.

#### 4.4.5 Sistema de detección.

Para la detección de la fluorescencia se ensayaron dos esquemas. En el primero la fluorescencia colectada es enfocada sobre una fibra de cuarzo que la lleva hasta la entrada a un



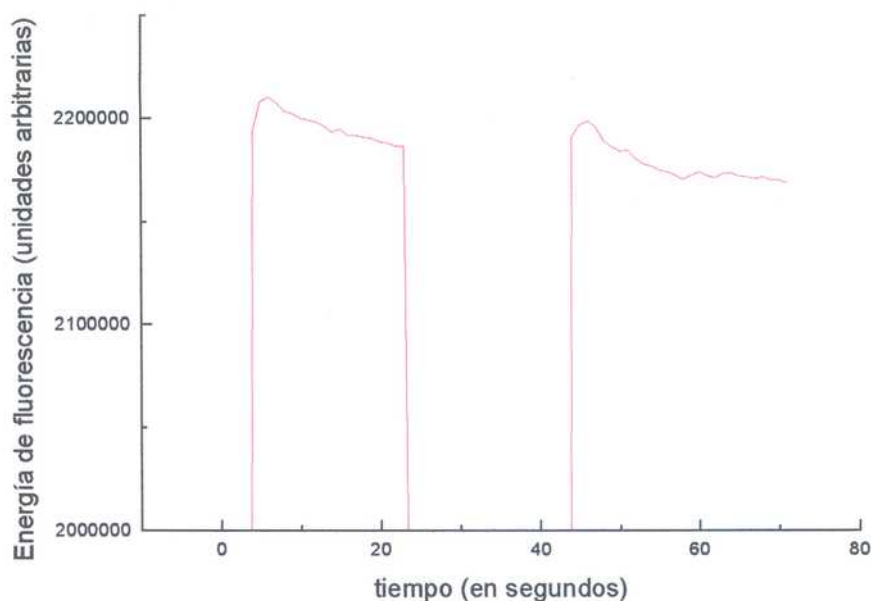


Figura 4.22: Señal de fluorescencia con una excitación de  $10mw$  en función del tiempo

de la emisión de fluorescencia se detecta con un fotomultiplicador. La fibra permite también hacer una discriminación espacial de la zona excitada de la muestra, colectando sólo la luz proveniente del volumen donde se superponen los dos pulsos.

En el segundo esquema el monocromador fue reemplazado por filtros para eliminar la luz dispersa del láser, y el fotomultiplicador por un fotodiodo de silicio.

Si bien el primer esquema es superior en cuanto a la eliminación de luz dispersa del láser y fuentes de luz espúrea, la relación señal/ ruido conseguida con el fotodiodo es superior en un factor 10. En este esquema, además, la fluorescencia colectada es en toda la banda de emisión. Por lo tanto es posible filtrar la luz dispersa sin recortar la emisión de fluorescencia. Por el contrario en el caso de usar el monocromador medimos solo la fluorescencia correspondiente al máximo.

En los dos esquemas la señal obtenida por el detector se conecta a la entrada de un amplificador lockin (Stanford 890) donde además de filtrar y amplificar se promedia la



#### 4.4.6 Energía de excitación y fracción de moléculas excitadas

La señal detectada, según fue explicado en el capítulo anterior, depende fuertemente de la cantidad de moléculas excitadas con cada uno de los pulsos a través del factor  $K$  definido en 2.14. Para hacer una estimación de este valor tuvimos en cuenta que la potencia media de excitación era en promedio  $20\text{ mW}$ . Como la repetición de pulsos es de  $72\text{ MHz}$  la energía por pulso resulta ser del orden de  $200\text{ pJ}$ .

De la medición de la cintura en el punto de enfoque obtenemos que  $w_o < 80\text{ }\mu\text{m}$  con lo que podemos suponer que el área de enfoque es de  $10^{-4}\text{ cm}^2$  por lo tanto el flujo de fotones en la muestra por cada pulso es  $5.6\text{ }10^{12}\frac{1}{\text{cm}^2}$ .

El ancho de pulso medido por autocorrelación es  $200\text{ fs}$ , por lo tanto la intensidad incidente :  $10\frac{\text{MW}}{\text{cm}^2}$  Con estos valores y de acuerdo a la definición dada en 2.14 resulta  $K = 1.2\text{ }10^{-4}$ .

Por lo tanto la fracción de moléculas excitadas es de acuerdo a la expresión 2.18

$$\beta(t = 0^+) = \frac{n_e(t = 0^+)}{n_o} = \frac{2\pi}{15} (10K - 3K^2) = 5\text{ }10^{-4} \quad (4.8)$$

#### Energía diferencial

De acuerdo al modelo teórico presentado en el capítulo anterior la energía diferencial para el caso de la molécula de coumarina 153 resulta ser una biexponencial con dos tiempos de difusión distintos  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$ .

Para obtener una estimación de estos valores tomamos como referencia el trabajo [44] donde se midieron estos tiempos para la misma molécula (Coumarina 153), en el mismo solvente (etylen glicol) y con el mismo láser de excitación utilizado en nuestro experimento, con similares niveles de intensidad y ancho temporal del pulso. Las mediciones se obtuvieron a través del ajuste de la curva de anisotropía de fluorescencia  $r(t)$  resuelta en

$$r(t) = r(0)(a_1 \exp(-\frac{t}{\Phi_1}) + a_2 \exp(-\frac{t}{\Phi_2})) \quad (4.9)$$

Donde  $r(0) = 0.369$  es la anisotropía medida usando como fuente de excitación un láser continuo,  $a_1$  es un parámetro a determinar con el ajuste,  $a_2 = 1 - a_1$ .

Los valores para los tiempos de difusión fueron medidos utilizando la técnica de mezclado de frecuencias y resultaron:  $\Phi_1 = 44 \text{ ps}$ , y  $\Phi_2 = 880 \text{ ps}$ .

Teniendo en cuenta estos valores y que el tiempo de fluorescencia es  $\tau = 4.5 \text{ ns}$  [44] podemos obtener la expresión para la energía diferencial que correspondería a esta molécula. Esto es la expresión obtenida en 3.21 correspondiente a una molécula elipsoidal con el dipolo en el plano  $x$  y que es la que mejor se ajusta para la coumarina 153 de acuerdo a las características de la molécula descritas en 4.19.

En la figura 4.23 se muestra una curva de energía diferencial en función del retardo para este caso, utilizando la relación 3.21. Se tomaron los valores para los tiempos de difusión obtenidos en [44].

También se grafica la curva que resulta de considerar sólo el decaimiento por fluorescencia suponiendo que no hay difusión. De la comparación entre estas curvas se aprecia cómo se modifica el decaimiento monoexponencial propio de la desexcitación por fluorescencia cuando se considera la difusión de las moléculas.

#### 4.4.7 Detección con el lock-in

La expresión para la energía diferencial normalizada obtenida en 3.21 muestra que la misma es proporcional a la fracción de moléculas excitadas obtenida en 4.8. Esto significa que las variaciones en la fluorescencia que se esperan detectar, correspondientes a la energía diferencial, serán del orden de  $10^{-4}$  del valor de la fluorescencia generada con un solo pulso. Esto significa que la señal a medir es menor en un factor 100 a las fluctuaciones en la fluorescencia propias del láser (del orden del 1%). Fue necesario por esta razón utilizar un amplificador lock-in a la salida del fotodiodo.

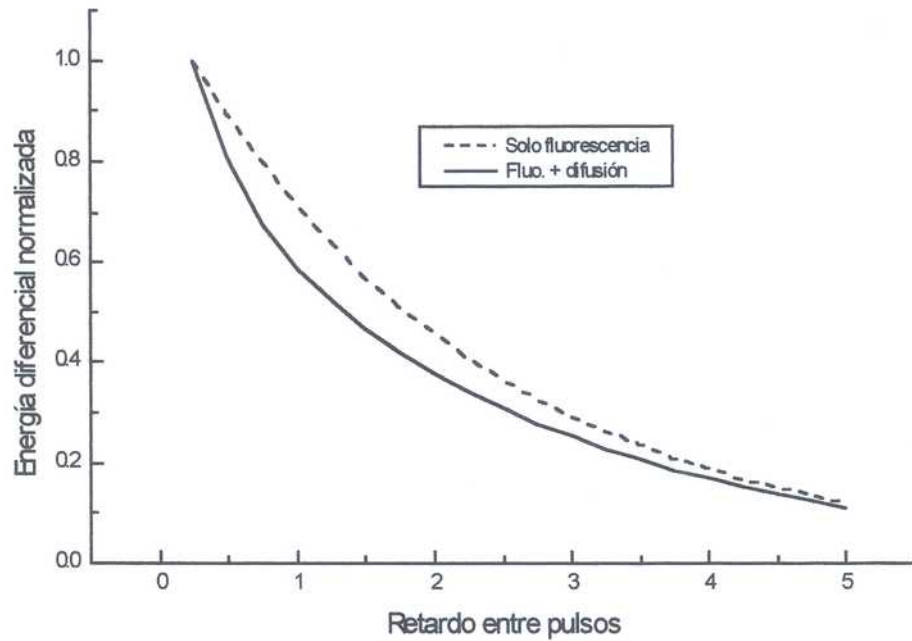


Figura 4.23: Energía diferencial en función del retardo de acuerdo a los parámetros dados en [44], para la Coumarina 153 en etylen glicol

consiste en modular por medio de un chopper ( Stanford 280) a cada uno de los haces con distinta frecuencia. A uno de ellos con una frecuencia  $w_1$  y al otro con una frecuencia  $w_2$ . Si suponemos, sin entrar en el detalle de la evolución angular discutida en el capítulo anterior, que la densidad de moléculas excitadas por el primer pulso con la modulación es:

$$n_e(t) = \beta(t)n_o \cos(w_1 t) \quad 0 < t < t_o \quad (4.10)$$

Donde el factor  $\beta(t = 0^+)$ , para  $t > 0$  representa la fracción total de moléculas que no decayeron al fundamental. Esta expresión coincide con la obtenida en 4.8

Al llegar el segundo pulso tendremos:

La fracción de moléculas excitadas que originará la señal de fluorescencia, que denominamos energía diferencial, será:

$$n_d(t) = -\beta(t)\beta(t - t_o)n_o \cos(w_1t) \cos(w_2t) \quad t_o < t \quad (4.12)$$

De la expresión 4.12 podemos obtener la energía diferencial como:

$$E_d(t) = \int_0^T -\beta(t')\beta(t' - t_o)n_o dt' \cos(w_1t) \cos(w_2t) \quad (4.13)$$

Donde los limites de la integral van desde  $t = 0$  momento en que llega el primer pulso de excitación hasta  $t = T$  que representa la separación entre pulsos. En el experimento  $T = 13 \text{ ns}$ .

Esta expresión para  $E_d(t)$  se debe a que la medición se realiza con un detector lento. De esta manera la señal de fluorescencia es integrada en el tiempo entre pulsos. Por esa razón la señal detectada es proporcional a la energía diferencial de fluorescencia tal como fué definida en la expresión 3.19 y 3.20.

De acuerdo a 4.13 esta señal tiene una componente a  $w_1 + w_2$  y otra componente a  $w_1 - w_2$ .

#### 4.4.8 Resultados experimentales

Algunos ejemplos de los resultados experimentales obtenidos con el esquema de la figura 4.12 se muestran en los gráficos 4.24 y 4.25 .

En cada una de estas figuras se presentan tres gráficos. En el segundo (gráfico b)) la señal es directamente la tensión medida con el lockin a la frecuencia suma cuando  $f_1 = 720 \text{ Hz}$  y  $f_2 = \frac{5}{6}f_1 = 600 \text{ Hz}$ . La modulación se realiza con un chopper ubicado en las ramas del sistema de retardo según lo indicado en la figura 4.12.

Llamaremos a este valor  $E_d(t_o)$  ya que, de acuerdo a lo obtenido en 4.13, es el valor medido que se corresponde con la energía diferencial según la definición dada en 3.21.

En este caso la señal fue detectada con un fotodiodo de silicio (Thorlab) sobre una re-

señal obtenida corresponde a la energía diferencial no polarizada.

En el gráfico c) se muestra la señal tomada en el mismo momento pero iluminando sólo con la rama variable (un solo pulso de excitación). Como ya se indicó en la sección anterior, esta señal se utiliza como medida de las fluctuaciones en la señal de fluorescencia debido a variaciones en la divergencia del haz y permite cancelar este error utilizandola como señal de normalización.

En el gráfico a) se muestra la curva de energía diferencial normalizada en función del retardo. Para obtener esta curva, utilizamos la definición dada en la sección anterior:

$$Edn(t_o) = -\frac{E_d(t_o)}{E_p(t_o)} + \frac{E_d(t_o = \infty)}{E_p(t_o = \infty)} \quad (4.14)$$

Donde  $E_d(t_o)$  es la señal de fluorescencia obtenidas a la frecuencia  $f_1 + f_2$ , y con un retardo  $t_o$ . El valor de  $E_d(t_o = \infty)$  es obtenido para retardos entre 1,5 y 2ns.

$E_p(t_o)$  es la energía de fluorescencia obtenida a la frecuencia  $f_1$ .

Como se ve en 3.21 la expresión para  $E_d$  es proporcional a  $K^2$  y esto se debe a que estamos suponiendo que los dos pulsos son iguales. Una expresión más cercana al caso experimental surge de suponer que cada pulso tiene intensidades distintas y que además el haz correspondiente a la rama móvil tendrá una variación con el retardo al cambiar el tamaño de la cintura sobre la muestra de acuerdo a lo discutido anteriormente. Por lo tanto la expresión para la energía diferencial será en este caso proporcional a  $K_1.K_2(t_o)$  en lugar de  $K^2$ .

Por otro lado la energía  $E_2(t_o)$  es también proporcional a  $K_2(t_o)$ . De esta manera al hacer el cociente en el cálculo de  $E_{dn}(t_o)$  cancelamos la dependencia de  $K$  con el retardo.

De la expresión 3.21 se ve que la curva esperada para la energía diferencial en función del retardo debería ser una biexponencial con dos tiempos de difusión. Sin embargo de acuerdo a las medidas obtenidas en [44] uno de los tiempos es un factor 20 veces menor y con un peso, dado por los coeficientes ( $a_1 = 0.05$  y  $a_2 = 0.95$ ), también 20 veces menor.



Medición energía dif. en coumarina 153+etylenglicol

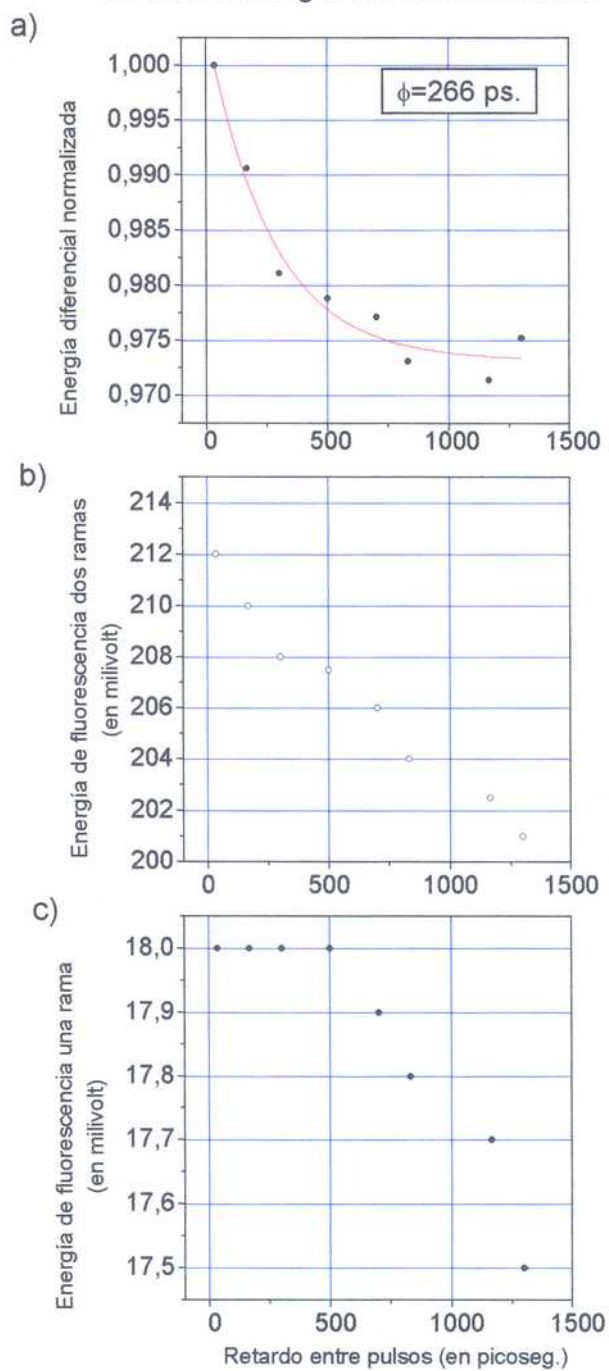


Figura 4.24:

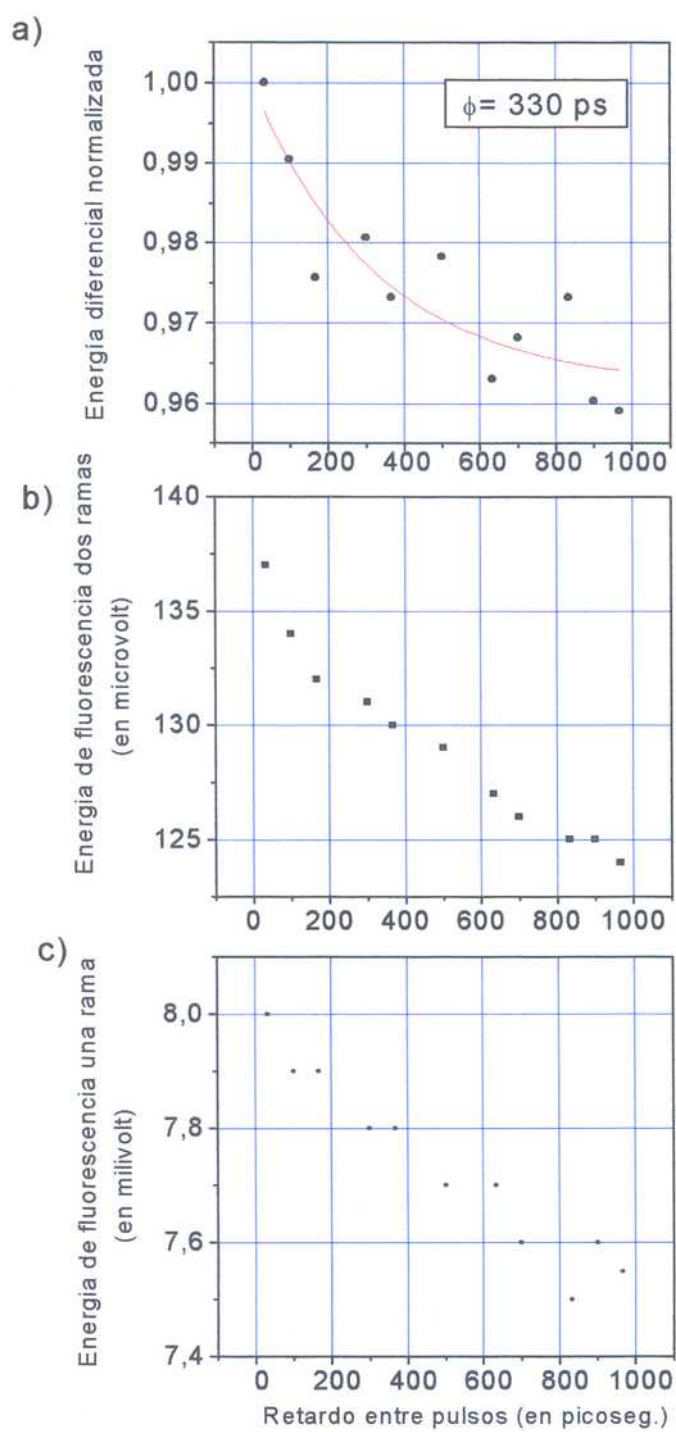


Figura 4.25:

un tiempo único de rotación dado por la relación. :

$$\Phi = \left( \frac{a_1}{\Phi_1} + \frac{a_2}{\Phi_2} \right)^{-1} = 398 \text{ ps.} \quad (4.15)$$

Este tiempo es obtenido como un promedio pesado entre  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$  y es sugerido en el trabajo de [44]. El valor indicado en 4.15 corresponde a los parametros del ajuste  $a_1$  y  $a_2$ , y los tiempos  $\Phi_1$  y  $\Phi_2$  medidos en este trabajo. La decisión de asumir este tiempo en nuestro caso se debe a que el ajuste biexponencial requiere una resolución temporal en la medición y una densidad de puntos con la que no contamos en nuestras mediciones.

De las curvas obtenidas en nuestro experimento, los valores medidos para este tiempo de rotación difusional ( $\Phi$ ), se encuentran entre  $200\text{ps}$  y  $400\text{ps}$ , suponiendo siempre un ajuste monoexponencial. La expresión de energía diferencial utilizada para realizar el ajuste es la misma que en 4.3.

Un promedio entre los valores medidos resulta :

$$\Phi = 320 \text{ ps.} \quad (4.16)$$

En las figuras 4.24 y 4.25, el valor del tiempo de difusión rotacional que resulta del ajuste se indica en el mismo gráfico ( $\Phi$ ).

## Capítulo 5

### Conclusiones

En este trabajo estudiamos la influencia de la difusión rotacional en el movimiento de reorientación molecular a través del análisis de la fluorescencia total producida después de una doble excitación. A partir de ese estudio propusimos una técnica para la medición de tiempos de difusión rotacional basada en la medición de la fluorescencia total después de la doble excitación y comparandola con el doble de la fluorescencia producida con una excitación simple. Los resultados teóricos presentados en los capítulos 3 y 4, fueron obtenidos para los casos en donde la molécula es esférica o elipsoidal. Sin embargo el modelo y la expresiones para la población del fluoróforo obtenidas después de la resolución de la ecuación de evolución, podrían extenderse a casos más generales donde la molécula fuera asimétrica.

En los casos estudiados se mostró que la energía diferencial, en función del retardo entre pulsos, tiene una expresión que es suma de decaimientos exponenciales, uno por cada tiempo de difusión. Estos decaimientos tienen tiempos característicos que son suma del tiempo de fluorescencia y el tiempo de rotación. Con esto se mostró que la energía diferencial es una magnitud factible para la obtención de tiempos de rotación.

El trabajo experimental se desarrolló con el objetivo de tener un esquema que permita la medición de energía diferencial en función del retardo, a partir de mediciones de energía de fluorescencia. Con el primer esquema armado, que incluyó el diseño y construcción

curvas de energía diferencial sigue el decaimiento exponencial esperado. A partir de estas mediciones se obtuvieron valores de tiempos de difusión rotacional, aunque los valores medidos presentan una gran dispersión y tienen diferencias con los valores medidos por otras técnicas [7].

Una mejora sustancial en el esquema experimental se consiguió con el uso de pulsos láser ultracortos. En especial en el caso del láser de titanio - zafiro los resultados obtenidos son alentadores. Si bien existe una diferencia entre los valores medidos con nuestra técnica y los obtenidos en el trabajo de Marroncelli et al [44]; estas dependen de los parámetros elegidos en el ajuste, de acuerdo a la discusión dada en la sección anterior. Como ejemplo un cambio en el parámetro  $a_1 = 0.05$  (medido en [44]) a  $a_1 = 0.1$  alcanza para obtener  $\Phi = 300$  ps que es el valor promedio obtenido experimentalmente en nuestras mediciones. Como conclusión final se incluyen una serie de ventajas y limitaciones que presente esta técnica.

En primer lugar las limitaciones encontradas son:

- 1- La condición  $\tau \geq \Phi$  debe cumplirse necesariamente y esto pone una cota superior a los tiempos a medir.
- 2- En el experimento tiempos de difusión del orden del nanosegundo requieren un gran esfuerzo para la alineación de la línea de retardo. La divergencia del haz de la rama móvil necesariamente cambia con el retardo y el efecto es notable para tiempos en este orden y lo mismo sucede con el desplazamiento lateral. Si bien ambos pueden solucionarse, esto implica tener que medir la fluorescencia con un pulso, hacer la normalización y montar un sistema de control de alineación antes de cada medición.
- 3- Los valores obtenidos para la energía de fluorescencia dependen principalmente de cuál es la inhomogeneidad producida en la muestra con la primera excitación. Por esta razón para aumentar la señal de energía diferencial es necesario aumentar la intensidad del pulso de excitación. En este sentido intensidades altas ( $\geq 10 \text{ MW/cm}^2$ ) podrían generar efectos no lineales que distorsionen los valores obtenidos. Esto representa una limitación

Entre las ventajas podemos mencionar:

- 1- Los tiempos de difusión rotacional pueden ser obtenidos en forma directa, ya que solo una medición (la energía diferencial) es necesaria para ajustar luego el decaimiento exponencial.
- 2- Las distintas definiciones de energía diferencial presentan alternativas que pueden simplificar notablemente el esquema experimental. Para la medición de  $Ed_p$ ,  $Ed_e$ ,  $Ed_t$ , es necesario una medición de fluorescencia polarizada, en este sentido  $Ed_t$  presenta una ventaja adicional, y es que los coeficientes que multiplican a las exponenciales no dependen de los tiempos de difusión o de fluorescencia. Para el caso de  $Ed_{np}$  no se necesitan polarizadores en la detección pero en este caso los coeficientes de los términos exponenciales tienen expresiones más complejas.
- 3- No se necesitan detectores rápidos ya que la fluorescencia es integrada en el tiempo y la resolución de la técnica está limitada solo por el ancho temporal del pulso de excitación.
- 4- La ecuación propuesta para el cálculo teórico de la evolución del sistema se basa en la idea de un proceso de difusión, sin embargo la técnica experimental no se limita al estudio de este tipo de procesos, y podría aplicarse a la determinación de tiempos de rotación de la molécula fluorescente aún cuando su evolución esté determinada por otro tipo de interacción con el medio.  
 Esto significa que el concepto de población diferencial y energía diferencial puede extenderse a situaciones donde los modelos de difusión no se cumplen y esto es interesante teniendo en cuenta que las fuentes de excitación (láser de pulsos ultracortos) pueden alcanzar anchos de pulso en el orden del femtosegundo. En el caso en que la resolución en la medición de los tiempos de rotación pueda estar en este orden es posible estudiar procesos rápidos donde el proceso browniano puede dejar de tener validez.
- 5- Es posible extender la técnica para realizar simultáneamente con las mediciones de flu-



los tiempos de difusión rotacional de la molécula en estado excitado y la molécula en su estado fundamental, que no necesariamente deben ser iguales. En la bibliografía consultada no se encontró ningún tipo de medición de este tipo.

# Bibliografía

- [1] H. E. Lessing and A. von Jena, *Laser Handbook*, edited by M. L. Stitch, North Holland, New York, 1979, Vol 3.
- [2] Lakowicz J., " *Principles of Fluorescence Spectroscopy*", Plenum press, New York
- [3] Simon J., " *Ultrafast Dynamics of Chem. Systems.*" , Klumer Ac. Publisher, (1994).
- [4] G. R. Fleming, *Chemical applications of ultrafast spectroscopy*, Oxford, New York, 1986
- [5] Weigert F., *Verh. Dtsch. Phys. Ges.* 1920, 23, 100
- [6] Lummer, O. *Müller-Pouillet's-Lehrbuch der physik und Meterologie*, vol II .
- [7] Kawski A., *Critical Reviews in Analytical Chem.*, 23 (6), 459, 1993
- [8] P. Debye, *Polar Molecules*, Dover pub. 1954
- [9] F. Perrin, *J. Phys. Radium*, 5, 497 (1934)
- [10] F. Perrin, *J Phys. Radium*, (1936)
- [11] Memming, R. *Z. Phys. Chem.* 1961, 28, 168.
- [12] R. Bauer, *Z. Naturforsch. Teil A*, 1963,18,718 - R. Bauer, A Balter, A Kowalczyk, Ch. Jung *Z. Naturforsch. Teil A*, 1980,35, 1319
- [13] A. Gierer, K. Wirtz, *Z. Naturforsch A*, 8, 532, (1953)

- [15] G. K. Younggreen, A. Acrivos, J. Chem. Phys., 63, 3846 (1975)
- [16] C. M. Hu, R. Zwanzig, J. Chem. Phys, 60, 4354 (1974)
- [17] J. Dote, D. Kivelson, R. Schwartz, J. Phys. Chem. 85, 2169 (1981)
- [18] R. Klüner, A Dölle, J. Phys. chem A. 101, 9, 1657 (1997)
- [19] J. T. Hynes, R. Kapral, M. Weinberg, J. Chem. Phys., 61, 3256 (1977)
- [20] J. T. Hynes, R. Kapral, M. Weinberg, J. Chem. Phys., 69, 2725 (1978)
- [21] W. H. Furry, Physical Rev. 107, 1,7 (1957)
- [22] Favro L., Physical Rev. 119, 53 (1960)
- [23] Lombardi J., Dafform G., J. Chem. Phys. 44,3882. (1966)
- [24] Tao, Biopolymers 1969,8,609
- [25] G. Weber, J. Chem. Phys. 1971, 55, 2399
- [26] Chuang T., Eisinger K., J. Chem. Phys. 1972, 57, 5094
- [27] Jablonski A., Acta Phys. Pol. 1957, 26, 471
- [28] Ehrenberg M., Rigler R., Chem Phys. Letters. 1972, 14,539.
- [29] Belford G.,Belford R., Weber G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, 69,1392
- [30] Eisinger K. B., Drexage K. H., J. Chem. Phys. 1969, 51, 5720.
- [31] Shank C. V., Ippen E. P., Appl. Phys. Lett. 26,62 (1975).
- [32] D. Waldeck, A. J. Cross, D. B. Mc Donald and G. R. Fleming, J. Chem. Phys. 74, 3381 (1981)

- [34] A. J. Cross, D. H. Waldeck, and G. R. Fleming J. Chem. Phys. 78, 11, 6455 (1983)
- [35] Alavi D. S., R. S. Hartman, D. H. Waldeck J. Chem. Phys. 92, 7, 4055 (1990)
- [36] Hartman R. S., Konitsky W. M., Waldeck D. H., Chang Y. J., E. W. Castner Jr., J. Chem. Phys. 106, 7920 (1997).
- [37] D. Phillion, D. Kuizenga, A. Siegman, Appl. Phys. Lett. 27, 85 (1975).
- [38] A. von Jena, H. Lessing, Opt. Quantum Electron. 11, 419, (1979).
- [39] R. S. Moog , M. D. Edlger, S. G. Boxer, M. D. Fayer, J. Phys. Chem. 86, 24, 4694, (1982).
- [40] G. S. Beddard, T. Doust and G. P.
- [41] E. Small, I. Isenberg, Biopolymers, V15,1093, (1976).
- [42] M. E. Rose, "Elementary theory of angular momentum", Wiley, New York, (1957).
- [43]
- [44] M. L. Horng, J. A. Gardecki, and M. Marroncelli, J. Phys. Chem. A , 101, 1030 (1997).
- [45] K. Lindenberg, U. Mohanty, V. Seshadri, Physica 119A, 1 (1983).
- [46] Moog R. S., Bankert D. L., Marroncelli M., J. Phys. Chem. 97, 1496. (1993)
- [47] J Torga, J Etcheverry and M Marconi. Optics Comm.
- [48] J. Tischler, Tesis de seminario, FCEyN (1993)
- [49] A. Hnilo, Tesis de doctorado, FCEyN (1985).
- [50] A. Hnilo, O. Martinez, E. Quel, IEEE J. Q. Elect., QE-22, 20, (1986)

- [52] J. Torga, J. Tischler, M. Marconi, presentación AFA (1993)
- [53] J Torga and M. Marconi, Procc. International Conference on Laser '96, (1996)
- [54] J Torga, J Etcheverry and M. Marconi, Procc. International Conference on Laser '97, (1997).
- [55] J. Torga, M Marconi, enviado a CLEO 1999.
- [56] M Ehrenberg and R Rigler, Chemical Physics Letters, Vol. 14, 5, (1972), 539